

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年4月12日 (12.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/24628 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A01K 67/027, A61P 13/12, A61K 45/00, C12N 15/12, 15/85, G01N 33/15, 33/50
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06988
- (22) 国際出願日: 2000年10月6日 (06.10.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/285736 1999年10月6日 (06.10.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 黒川清 (KUROKAWA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒162-0061 東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 宮田敏男 (MIYATA, Toshio) [JP/JP]; 〒259-1132 神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原102号 Kanagawa (JP).
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

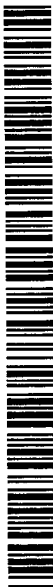
(54) Title: MODEL ANIMAL OF MESANGIAL CELL PROLIFERATIVE NEPHRITIS

(54) 発明の名称: メサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物

(57) Abstract: A model animal of mesangial cell proliferative nephritis obtained from a megsin transgenic animal. A transgenic mouse constructed by using a megsin gene exhibits typical symptoms of mesangial cell proliferative nephritis associated by the enlargement of the mesangial base region, the sedimentation of an immune complex and an increase in mesangial cells. This model animal of mesangial cell proliferative nephritis is useful in analyzing the pathological conditions of chronic glomerular diseases and screening remedies therefor.

(57) 要約:

メグシントランスジェニック動物による、メサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物が提供された。メグシン遺伝子によるトランスジェニックマウスは、メサングウム基質領域の増生と免疫複合体の沈着およびメサングウム細胞の増加を伴う典型的なメサングウム細胞増殖性腎炎症状を示した。本発明のメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物は、慢性糸球体疾患の病態解析や治療薬スクリーニングに有用である。



WO 01/24628 A1

明細書

メサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物

技術分野

本発明は、トランスジェニック動物によるメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物に関する。

背景技術

メサンギウム細胞(mesangial cell)は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしている。またメサンギウム細胞は、各種腎炎においても中心的な病態生理学的意義を有する。例えばメサンギウム細胞の増殖、および細胞外メサンギウム基質(extracellular mesangial matrix)の蓄積は、慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症のような様々な糸球体疾患の患者の糸球体硬化症の重要な病理所見である。

一般に病態の解析を進めるうえで、モデル動物の果たす役割は大きい。たとえば、c-myc 癌遺伝子が導入されたトランスジェニックマウス（米国特許5087571）は、白血病のモデル動物として病態解明に大きく貢献した。メサンギウム細胞の増殖症状を呈するモデル動物が実現すれば、様々な糸球体疾患のモデルとなることが予測されるが、現実にはこのようなモデル動物は知られていない。

ヒトの慢性糸球体腎炎は、腎不全に至る進行性糸球体病変の大きな原因となっており、その動物モデルを利用した病因の解明が待たれている。メサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物の提供は、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療薬の探索や検定において重要な実験材料となりうる。

メサングウム細胞のマーカーとしては、ラットでは Thy1 抗原が知られている。しかしこの遺伝子はメサングウム細胞特異的ではないうえ、ヒトではメサングウム細胞には発現していない (Miyata T. et al., *Immunology*(1989); 67: 531-533; Miyata T. et al., *Immunology*(1990); 69: 391-395)。また、メサングウム細胞は活性化されると α 平滑筋アクチンを発現することが知られているが、この遺伝子もメサングウム細胞特異的ではない。したがって、これらの遺伝子をもとにトランスジェニック動物を作製しても、メサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物は得られないものと推測される。

これまで、一般的にはマウスにおける腎疾患モデルの作製は難しいとされていた。そこで、しばしば基底膜に対する抗体 (抗 GBM 抗体) を投与する腎炎モデルが使用されてきた。しかしこのモデルは個体間の症状の発現レベルに差を生じやすく、またラットに比べて顕著な病変が得にくいなどの問題があった。

近年になって、Johnson のグループは抗糸球体抗体の投与による腎疾患モデル動物を報告した。彼らの腎疾患モデル動物は、重篤な糸球体障害を呈し、糸球体半月(crescent)の形成を示す。しかし、これらの病態はいずれもヒトにおける急速進行性糸球体腎炎に相応していると考えられる (Ophascharoensuk et al. *Kidney Int* 54, 416, 1998)。このため、よりヒト慢性糸球体腎炎に近い病態を示すモデル動物の実現が待たれていた。

このような要求に応えるため、最近では遺伝子操作によるモデル動物の作製が試みられている。たとえば、SV40 によるもの (MacKay et al. *Kidney Int* 32, 827, 1987) や成長ホルモンによるもの (Doi et al. *Am J Pathol* 137, 541, 1990) が有名であるが、これらは糸球体硬化が主病変で糸球体における増殖性変化に乏しい。インターロイキン-6 の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが腎不全を呈することも知られているが、主病変は糸球体硬化と尿細管間質障害である (Fattori et al. *Blood* 83, 2570, 1994)。また、レニンとアンギオテンシンの遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (Tsukuba hypertensive

mice)は、糸球体硬化を呈することが知られている(Shimokama et al. Virchows Arch 432, 169, 1998)。しかしこの障害は高血圧症状によってもたらされるもので、やはりヒトにおける糸球体障害のモデル動物とはなりえない。このように、メサンギウム細胞の増殖やメサンギウム基質の増生を伴う、ヒトの糸球体疾患のモデルとなりうるトランスジェニック動物は知られていない。従来のトランスジェニックマウスにおける腎病変は、しばしば他の目的で導入された遺伝子の影響によって、いわば偶然の産物として発見されたものが多い。したがって、ヒトの糸球体疾患のモデル動物を得るために、どのような遺伝子を用いるべきかを示唆する報告は無かったと言える。

なお本発明者は、先にメサンギウム細胞に特異的に発現しているタンパク質としてメグシンを報告している(J.Clin. Invest, 1998 Aug 15, 120:4, 828-36)。しかし、このタンパク質をコードする DNA を導入することによってメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物を得られることは知られていない。

発明の開示

本発明は、メサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物と、その作製方法の提供を課題とする。また、本発明によって得ることができるメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物を用いた治療薬のスクリーニング方法を提供することも、本発明の課題である。

前記課題の解決のために、本発明者はメグシンとそれをコードする DNA に着目した。メグシンは、メサンギウム細胞に特異的に発現する遺伝子によってコードされるタンパク質である(J.Clin. Invest, 1998 Aug 15, 120:4, 828-36)。ヒト・メグシン、あるいはラットやマウスにおけるそのホモログは、本発明者によって既にその構造が明らかにされ、特許出願されている(WO 99/15652)。しかしメグシンの過剰発現がメサンギウム細胞にどのような影響を与えるのかについては明らかにされていなかった。本発明者は、メグシンをコードする DNA の導入

によって作製されたトランスジェニックマウスが、典型的な腎メサンギウム細胞増殖性腎炎の症状を呈することを確認した。すなわち、約 35-40 週齢を迎えた前記トランスジェニックマウスの腎系球体組織では、メサンギウム細胞を主体とする著明な細胞増殖、メサンギウム基質の増生、並びに免疫グロブリンや補体から成る免疫複合体の沈着亢進が認められ、分節性の硬化(segmental sclerosis)に陥っていることが観察された。この観察結果に基づいて、メグシンをコードする DNA の導入によって、メサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物として有用なトランスジェニック動物を作製できることを見出し、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物、このモデル動物の作製方法と用途に関する。

- 〔1〕 ヒト・メグシン、またはヒト・メグシンと機能的に同等なタンパク質をコードする外来性の DNA を腎メサンギウム細胞において発現するトランスジェニック非ヒト動物であるメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物。
- 〔2〕 ヒト・メグシンをコードする DNA が、配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域からなる〔1〕に記載のメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物。
- 〔3〕 非ヒト動物がマウスである〔1〕に記載のメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物。
- 〔4〕 ヒト・メグシン、またはヒト・メグシンと機能的に同等なタンパク質をコードする DNA と、この DNA を動物の腎メサンギウム細胞において発現させることができるプロモーターとを含むメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物作製用組み換え遺伝子。
- 〔5〕 次の工程を含む、メサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物の作製方法。
 - a) 動物の受精卵に〔4〕に記載の組み換え遺伝子を導入する工程
 - b) 工程 a) の受精卵から発生した初代トランスジェニック動物のうち導入した外来性遺伝子を保持した個体を選択する工程

〔6〕 更に次の工程 c) および d) を含む〔5〕に記載のメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物の作製方法。

c) 工程 b) で選択した個体と正常動物を交配させて外来性遺伝子をヘテロで保有する F 1 動物を得る工程

d) 工程 c) で得た F 1 動物同士を交配させて外来性遺伝子をホモで保有する F 2 動物を得る工程

〔7〕 次の工程を含む、メサングウム細胞増殖性腎炎に対する候補化合物の治療効果を評価する方法。

a) 〔1〕に記載のメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物に候補化合物を投与する工程、

b) 前記モデル動物における腎炎症状の変化を観察する工程

〔8〕 次の工程を含む、メサングウム細胞増殖性腎炎治療用の化合物をスクリーニングする方法。

a) 〔1〕に記載のメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物に候補化合物を投与する工程、

b) 前記モデル動物における腎炎症状の変化を観察する工程

c) メサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物の腎炎症状を緩和する化合物を選択する工程

〔9〕 〔8〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を主成分として含む、メサングウム細胞増殖性腎炎の治療、および／または予防用医薬組成物。

あるいは本発明は、ヒト・メグシン、またはヒト・メグシンと機能的に同等なタンパク質をコードする DNA と、この DNA を動物の腎メサングウム細胞において発現させることができるプロモーターとを含む組み換え遺伝子の、メサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物の作製における使用に関する。

本発明によるメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物は、公知のトランスジェニック動物の作製方法によって得ることができる。本発明におけるメサングウム細胞増殖性腎炎とは、腎メサングウム細胞の増殖とメサングウム基質の増生を伴う腎疾患を意味する。このような腎疾患には、たとえば IgA 腎症、膜性増殖性糸球体腎炎、SLE(systemic lupus erythematosus)腎症、糖尿病性腎症、あるいはクリオグロブリン腎症等が知られている。トランスジェニック動物は、たとえば「発生工学実験マニュアル」（野村達次監修、勝木元也編、講談社、1989年）や、「新生化学実験講座・動物実験法」（日本生化学会編、東京化学同人、1991年）などに従って作製される。以下に、一般的なトランスジェニック動物の作製プロトコールに従って述べる。

本発明において、ヒト・メグシンとは、配列番号：1に示す塩基配列を持つ DNA によってコードされるタンパク質である。その推定アミノ酸配列を、配列番号：2に示す。本発明のトランスジェニック動物は、ヒト・メグシンのみならず、ヒト・メグシンと生物学的に同等な機能を有するタンパク質をコードする DNA を導入したものであることができる。このようなタンパク質としては、たとえば他の種におけるメグシンのホモログを示すことができる。メグシンのホモログには、たとえばラット・メグシン、そしてマウス・メグシンの構造が本発明者によって明らかにされている。ラットメグシンの塩基配列、並びにアミノ酸配列を配列番号：3、および配列番号：4に、そしてマウス・メグシンの塩基配列、並びにアミノ酸配列を配列番号：5、および配列番号：6に示す。

また、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように多形現象を示すことが多い。この多形現象によって、アミノ酸配列に1個あるいはそれ以上のアミノ酸の置換を生じても、通常タンパク質の活性は維持される。また一般に、1個または数個のアミノ酸の改変では、タンパク質の活性は維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変

したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が腎メサングウム細胞増殖性腎炎をもたらす限り、すべて本発明に利用することができる。以下、ヒト、ラット、あるいはマウスに由来するメグシンと、その生物学的に同等な機能を有するタンパク質を総称してメグシン類と記載する。なおメグシン類としてマウスに由来するメグシンをコードする DNA をマウスに導入する場合であっても、人為的に導入したマウスに由来する DNA は外来性の DNA である。しかしながら、本発明によるトランスジェニック動物をメサングウム細胞増殖性腎炎のモデル動物として、ヒトにおける治療剤に有用な化合物のスクリーニングを行うには、ヒト・メグシンの DNA を用いるのが有利である。トランスジェニック動物の体内でヒト・メグシンに対する影響を、より忠実に反映できる可能性が期待できるためである。

また、アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる [Grantham, R. et al. *Nucleic Acids Res.* 9, r43 (1981)]。従って、コドンの縮重を考慮して、DNA を適宜改変したものもまた本発明の DNA に含まれる。さらに、これら核酸配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法 (sitespecific mutagenesis) [Mark, D.F. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81,5662 (1984)] 等に従うことができる。

更に、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5のいずれかに記載の塩基配列を含む DNA とハイブリダイズすることができ、かつその DNA によってコードされるタンパク質が腎メサングウム細胞増殖性腎炎をもたらす限り、その DNA は本発明による DNA に含まれる。ストリンジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジェントな条件とは、洗浄のための条件として通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度、より厳しい条件として

は「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度、さらに厳しい条件として「0.1xSSC、0.1% SDS、55℃」程度を示すことができる。加えて、本発明におけるメグシン類をコードする DNA は、トランスジェニック動物に腎メサングウム細胞増殖性腎炎をもたらす限り、その断片を利用することもできる。

本発明においてトランスジェニック動物の作製に用いられるメグシン類をコードする DNA は、本明細書に開示した塩基配列に基づいて公知の方法により得ることができる。たとえば、メサングウム細胞の cDNA ライブラリーを配列番号：1、配列番号：3、あるいは配列番号：5に示した塩基配列からなる DNA をプローブとしてスクリーニングすることにより、メグシン類をコードする cDNA の単離が可能である。またこの cDNA ライブラリーを鋳型として、配列番号：1、配列番号：3、あるいは配列番号：5に示した塩基配列に基づいて設定したプライマーを用いて PCR を行うことによって、メグシン類をコードする DNA を増幅することができる。増幅生成物は、公知の方法に基づいてクローニングする。

メグシン類をコードする DNA は、この遺伝子を導入すべき動物の細胞において発現可能なプロモーターに連結した組み換え遺伝子コンストラクトとするのが有利である。本発明の組み換え遺伝子コンストラクトは、適当な宿主を利用してクローニング可能なベクターに、前記メグシン類をコードする DNA と、その上流にプロモーターとを挿入し、クローニングすることによって構築することができる。本発明に利用することができるプロモーターとしては、マウスやラットなど、幅広い脊椎動物で外来遺伝子の発現を誘導できるニワトリ β アクチン・プロモーターを示すことができる。

また、外来遺伝子の発現を増強するために、エンハンサーを組み合わせることもできる。たとえば、CMV に由来するエンハンサーは、哺乳動物における外来遺伝子の発現を増強することが知られている。

これらの遺伝子から構成される組み換え遺伝子コンストラクトの構築にあたり、エンハンサーとプロモーターを備え、更にその下流に外来遺伝子挿入用のマルチ

クローニングサイトを配置したベクターを用いることができる。このような構造を持つベクターは、たとえば pCAGGS(Niwa H, Yamamura K and Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108,193-200.)等をもとに実施例に示すような方法によって構築することができる。このベクターは、マルチクローニングサイトの下流にウサギ β グロビン・ターミネーターが配置されており、挿入された外来遺伝子の発現効率の向上に貢献する。

適当な制限酵素によって前記ベクターから切り出した組み換え遺伝子コンストラクトは、十分に精製されトランスジェニック動物の作製に用いられる。トランスジェニック動物は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに、前記コンストラクトを導入することによって作製される。コンストラクトを導入する細胞としては、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階、より具体的には単細胞あるいは受精卵細胞の段階で、通常8細胞期以前のものが利用される。コンストラクトの導入方法としては、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法等が公知である。さらに、こうして得られた形質転換細胞を上述の胚芽細胞と融合させることによりトランスジェニック動物を作製することもできる。

コンストラクトを導入する細胞は、トランスジェニック動物の作製が可能なあらゆる非ヒト脊椎動物に由来する細胞であることができる。具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、イヌ、あるいはネコ等の細胞を利用することができる。たとえばマウスにおいては、排卵誘発剤を投与したメスのマウスに正常なオスのマウスを交配させることにより、コンストラクトの導入が可能な受精卵を回収することができる。マウス受精卵では、一般に雄性前核へのマイクロインジェクションによりコンストラクトが導入される。コンストラクトを導入した細胞は、体外での一晚程度の培養の後、導入

に成功したと思われるものが代理母の卵管に移植され、トランスジェニックキメラ動物が誕生する。代理母には、精管を切断したオスと交配させて偽妊娠状態としたメスが利用される。

生まれたトランスジェニックキメラ動物は、その体細胞の遺伝子を解析することによって、ゲノムに外来遺伝子（メグシン類をコードする DNA）が組み込まれていることを確認した上で、F 1 動物の誕生のために正常な動物と交配させる。このとき、望ましくは、より多くのコピー数を持つ個体を選択するようにする。一般にコンストラクトとして導入した外来性の DNA は、ゲノムの同一の部分に複数コピーが直列に組み込まれる。通常はこの組み込みコピー数が多いほど、多量の遺伝子発現につながり、より明瞭な発現型が期待できるためである。体細胞ゲノムにおいて、外来遺伝子（メグシン類をコードする DNA）が正しい方向で組み込まれていることは、コンストラクトに特異的なプライマーを用いた PCR によって確認することができる。また、ドットブロット法によって、コピー数の相対的な比較が可能である。

この交配の結果誕生する F 1 動物の中で、体細胞に外来遺伝子（メグシン類をコードする DNA）を備えるものは、ヘテロサイゴート(heterozygote)ながら生殖細胞に外来遺伝子（メグシン類をコードする DNA）を伝えることができるトランスジェニック動物である。したがって、F 1 動物の中から体細胞に外来遺伝子（メグシン類をコードする DNA）を保持するものを選び、これらを両親とする F 2 動物を誕生させることができれば、外来遺伝子（メグシン類をコードする DNA）をホモで保持するホモサイゴート動物(homozygote animal)が F 2 動物として得られる。

本発明の腎メサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物には、メサングウム細胞で外来性のメグシン類の DNA を発現するものである限り、これらトランスジェニック動物のいずれの世代であっても、利用することができる。たとえば、メグシン類の DNA をヘテロで保持するトランスジェニック動物であっても、この外来

性のメグシン類がメサンギウム細胞で発現すれば、腎メサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物として有用である。

なお本発明においては、外来性のメグシン類の DNA を、少なくともメサンギウム細胞で発現させることができれば、腎メサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物とすることができる。したがって、外来性のメグシン類の DNA を、必ずしも腎特異的に発現させなくてもよい。たとえば実施例に示すように、ヒトメグシンを全身性に発現するトランスジェニックマウスであっても、著明な腎メサンギウム細胞増殖性腎炎症状を得ることができる。

トランスジェニック動物が腎メサンギウム細胞増殖性腎炎の症状を呈していることは、次のような指標を観察することによって確認することができる。たとえば、腎臓組織の PAS 染色により、メサンギウム細胞数やメサンギウム基質の面積を観察し、増殖性糸球体腎炎の程度をスコア化することができる。具体的には、次のような病理所見が、本発明のトランスジェニック動物に典型的な所見として例示される。すなわち、約 35-40 週齢を迎えた本発明によるトランスジェニックマウスの腎糸球体組織では、メサンギウム細胞を主体とする著明な細胞増殖、メサンギウム基質の増生、並びに補体、免疫グロブリンから成る免疫複合体の沈着が認められ、分節性の硬化(segmental sclerosis)に陥っていることが観察される。

本発明のトランスジェニック動物による腎メサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物は、メサンギウムおよび糸球体内皮細胞領域の細胞増殖と細胞外基質の蓄積を慢性進行性に呈し、明確な腎メサンギウム細胞増殖性腎炎の症状を有する。また、腎炎誘発剤の注射や手術など、他の方法により作製したモデル動物に比べ、モデル動物を調製するための手間がかからず、均一な個体を多数供給することができる点でも優れている。従って、本発明のモデル動物は、腎メサンギウム細胞増殖性腎炎の病態解明や、治療薬開発のための大規模な薬剤スクリーニングに有用である。

本発明のメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物を利用して、メサングウム細胞増殖性腎炎に対する候補化合物の治療効果を評価することができる。本発明による評価方法は、以下の工程によって実施される。

- a) 本発明によるメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物に候補化合物を投与する工程、
- b) 前記モデル動物における腎炎症状の変化を観察する工程

また本発明のメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物を利用して、メサングウム細胞増殖性腎炎治療用化合物のスクリーニングを実施することができる。本発明によるスクリーニング方法は、次の工程によって実施される。

- a) 本発明によるメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物に候補化合物を投与する工程、
- b) 前記モデル動物における腎炎症状の変化を観察する工程
- c) 候補化合物を投与したモデル動物の腎炎症状を緩和する化合物を選択する工程

本発明の評価方法、あるいはスクリーニング方法において、腎炎症状は、腎臓組織の病理所見、あるいは、メグシン類の発現レベルを調整する活性を期待する場合には、メサングウム細胞におけるメグシン類の mRNA やタンパク質レベルの測定結果を指標として有効性の評価が行われる。腎臓組織の病理所見は、たとえば実施例に示すようなスコア化方法によって、そのレベルを比較することができる。一方 mRNA は、配列番号：1 に記載されたメグシン類をコードする DNA の塩基配列に基づいて設定されたプローブやプライマーを用いて、公知の方法にしたがって測定することができる。またメグシン類のタンパク質レベルを測定するには、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体を用いたイムノアッセイによって評価することができる。

したがって、候補化合物を投与する前後で、これらの指標の観察結果を比較することにより、候補化合物の治療薬としての有効性を評価することができる。あ

るいは、同系のトランスジェニック動物を用いれば、動物の間でこれらの指標の観察結果を比較することによって、候補化合物間の有効性を比較することもできる。

本発明のスクリーニングに用いる候補化合物としては、例えば、天然または合成化合物、各種有機化合物、天然または合成された糖類、タンパク質、ペプチド、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、あるいは菌体成分などを挙げることができる。この他、メグシン類の発現を制御するアンチセンス核酸や、メグシン類の活性抑制が期待される抗メグシン類抗体を候補化合物とすることもできる。これらの候補化合物は、メサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物に、経口的に、あるいは非経口的に投与される。

本発明のスクリーニング方法によって選択された候補化合物は、更に安全性や安定性などを試験したうえで、メサングウム細胞増殖性腎炎のための治療用、および／または予防用医薬組成物の主成分とすることができる。本発明の医薬組成物は、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することができる。また主成分である化合物自体を直接投与することもできる。製剤化する場合は、例えば、薬剤として一般的に用いられる媒体または担体と適宜組み合わせて投与することができる。

また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、鼻腔内投与、気管支内投与、筋肉内投与、皮下投与、経口投与、患部への直接投与などの方法で行うことができる。投与量は、患者の体重、年齢、健康度、あるいは投与方法などの条件によって変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することができる。

すなわち、たとえば本発明のメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物において、腎炎症状の緩和効果を、様々な投与量の間で比較することにより有効濃度が決定される。そして、上記のような各投与ルートによって、メサングウム細胞におけ

る投与化合物の濃度がその有効濃度に達するような投与量を経験的に決定する。一般的な投与形態においては、有効成分が全身に分布するものとして、体重 1 kg 当たりの投与量を決定する。実験動物における薬物動態の解析結果に基づいて腎移行性が高いと考えられる化合物であれば、投与量をより低く設定することができる。

本発明の医薬組成物は、決定された投与量と投与形態とを考慮して、媒体や担体と配合される。必要な投与量を達成することができるように有効成分を配合することは、当業者が通常行っている。本発明による医薬組成物の投与量は、体重 1kg あたり通常 $1\mu\text{g}$ – 10mg 、より一般的には $10\mu\text{g}$ – 1mg とすることができる。また、注射剤の場合は経口投与の 100 分の 1 程度を投与量の目安とすることができる。さらに特殊な製剤設計を施すことにより、投与量を調整することができる。例えば、本発明の医薬組成物は、適当な担体に保持することによって徐放化製剤とすることもできるが、このような製剤においては、高い血中濃度を維持することができるので、配合量を低く設定することができる。

本発明のメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物には、治療や予防に用いることができる化合物のスクリーニングのほかにも、次のような用途に有用である。まず、食餌療法に代表される生活習慣の改善の指針を検討するための材料とすることができる。あるいは、ヒトの糸球体腎炎と病理像が良く似ていることから、腎炎の病態解析に用いることができる。更に、本発明のトランスジェニックマウスがおよそ 35-40 週齢で糸球体腎炎の症状を自然発症することを利用して、糸球体腎炎の発症における遺伝的素因と環境因子の関連を明らかにするための実験材料としても有用である。

図面の簡単な説明

図 1 は、組み換え遺伝子コンストラクトの構築図を示す図である。A は pBsCAG-2 の構造を示す。B は pBsCAG2/Megsin、および卵へのマイクロインジェクションに用いた DNA 断片の構造を示す。

図 2 は、トランスジェニックマウスの腎メサングウム細胞におけるヒト・メグシン遺伝子の発現を解析したノーザンブロットの結果を示す写真である。レーン 1、3 がレーン 2、4 の非トランスジェニック同腹仔、レーン 2、および 4 がトランスジェニックマウス、レーン 5 は野生型のものである。各レーンのトランスジェニックマウスの系統は、以下に示すとおりである。レーン 1、2 は、系統 A、レーン 3、4 は系統 B、レーン 5 は野生型。

図 3 は、トランスジェニックマウスの腎臓組織におけるヒト・メグシンタンパク質の発現を抗ヒトメグシンペプチド抗体を用いたイムノブロットで解析した結果を示す写真である。レーン 1 は大腸菌で発現させたマルトース結合タンパク質・メグシン融合タンパク質（陽性対照）、レーン 2、および 4 は野生型マウスの腎臓、レーン 3、および 5 はトランスジェニックマウス（それぞれ系統 A、および B）の腎臓についての結果である。

図 4 は、F1 世代トランスジェニックマウス(a)、および、野生型マウス(b)の腎臓においてヒト・メグシン遺伝子産物を抗ヒトメグシンペプチド抗体を用いた免疫組織染色（イムノヒストケミスト）により検出した結果を示す写真である。倍率は 16 倍（挿入図については 50 倍）。

図 5 は、正常マウスおよびメサングウム細胞増殖性腎炎モデルマウスの腎臓の PAS 染色像を示す写真である。「Wild type littermate」は野生型、「Megsin Tg/+」はメグシントランスジェニックマウス（「ヘテロ」）の腎臓切片である。

図 6 は、糸球体の大きさ(a)、および糸球体あたりのメサングウム細胞の数(b)を、野生型マウス 25 匹、およびトランスジェニックマウス 19 匹について測定した結果を示す図である。トランスジェニックマウスについての測定値のうち、

○(open circle)は野生型マウスの平均値+2SD という基準以下のものを表し、
●(close circle)はこの基準を超えるものを表す。

図7は、免疫グロブリン (IgA, IgG, IgM) や補体から成る免疫複合体の糸球体メサンギウム領域への沈着を 40 週齢目の F1 世代トランスジェニックマウス (a)、および野生型マウス(b)について免疫蛍光染色により観察した写真である。倍率は 50 倍。

図8は、40 週齢目の F1 世代トランスジェニックマウス(a)、および野生型マウス(b)における、免疫複合体の糸球体メサンギウム領域への沈着を電子顕微鏡により観察した写真である。倍率は 2500 倍。

図9は、トランスジェニックマウスの各組織におけるヒトメグシン mRNA の発現を解析したノーザンブロットの結果を示す写真である。上から順に、腎臓、心臓、肝臓、そして肺の結果を示す。各組織の写真は、レーン 1 が野生型、レーン 2 がトランスジェニックマウス (系統 A)、レーン 3 がトランスジェニックマウス (系統 B) の結果である。上段がノーザンブロットの結果、下段が RNA 電気泳動後のエチジウムブロマイド染色の写真である。

図10は、トランスジェニックマウス及び野生型マウスの腎臓組織の免疫組織染色法による観察結果を示す写真である。上から順に、抗 I 型コラーゲン抗体、抗フィブロネクチン抗体、抗ラミニン抗体、そして抗 IV 型コラーゲン抗体による染色結果を示す。写真右側の列がトランスジェニックマウス (系統 A) の結果である。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] 組み換え遺伝子コンストラクト

CMV のエンハンサーとニワトリ β アクチン・プロモーターのハイブリッドである CAG プロモーターの制御下にヒト・メグシン cDNA を発現する発現ベクターを以下のように構築した。まず、ヒト・メグシンの開始コドンの直前の塩基配列を Kozak 配列 (GCCGCC) に置換するため、センスプライマー (B44F : 5'-ATGGATCCGCCGCCATGGCCTCCCTTGCTGCAGCAAATGCAGAG-3' / 配列番号 : 7) およびアンチセンスプライマー (H30-R : 5'-TATCCTGAGGCAGTGTTAACATGAAG-3' / 配列番号 : 8) を用いて、ヒト・メグシン cDNA を含むプラスミド (pUC-MEGSIN) (WO 99/15652) を鋳型に PCR を行い、開始コドン直前が Kozak 配列に置換されたヒト・メグシン cDNA の 5' 断片を増幅した。pUC-MEGSIN を制限酵素 BamHI および HpaI で切断し、メグシン cDNA の開始コドンを含む約 180bp の断片を取り除き、PCR で得られた断片を挿入して、Kozak 配列に置換されたヒト・メグシン cDNA を持つプラスミドを構築した。

大腸菌 JM109 に形質転換しクローニングした後、プラスミドを制限酵素 BamHI および HindIII で切断し、得られたメグシン全長を含む 1.2kb の断片を精製し、TaKaRa Blunting Kit (宝酒造製) を用いて平滑末端化した。pBsCAG-2(Kawarabayashi T, Shoji M, Sato M, Sasaki A, Ho L, Eckman CB, Prada C-M, Younkin SG, Kobayashi T, Tada N, Matsubara E, Iizuka T, Harigaya Y, Kasai K and Hirai S (1996) Accumulation of β -amyloid fibrils in pancreas of transgenic mice. Neurobiol. Aging 17, 215-222) を EcoRI により切断して直鎖にした後、同様に末端を平滑化し、アルカリフォスファターゼ (宝酒造製) により脱リン酸化処理を行った。このプラスミドに上記の 1.2kb の断片をライゲーションして組換えプラスミドを作製し、大腸菌 JM109 に形質転換しクローニングした。挿入されたヒト MEGSIN cDNA の方向性が chicken beta-actin promoter と同じクローンをシーケンシングにより選抜し、この組換えプラスミドを pBsCAG2Megsin とした (図 1 B)。なお、pBsCAG-2 は、pCAGGS (Niwa H, Yamamura K and Miyazaki J (1991) Efficient selection

for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108,193-200.、CMV エンハンサーおよびニワトリ β アクチン・プロモーターおよびウサギ β グロビン・ターミネーターを持つ哺乳動物細胞発現ベクター)の SalI-PstI 断片を プラスミドベクター pBluescript (登録商標) II SK(-) (Stratagene 社) の SalI-PstI 部位に組込んで作製された (図 1 A)。

pBsCAG2Megsin を制限酵素 ScaI、SalI、および NotI で切断し、アガロースゲル電気泳動後、Megsin cDNA を含む約 3.4kb の断片を切り出して回収し、トランスジェニックマウスの作製に使用した (図 1 B)。

[実施例 2] トランスジェニックマウスの作製

インジェクションの 3 日前夕方に PMSG (妊馬血清ゴナドトロピン) を 8-20 週齢の雌マウス (C57BL/6 と C3H の F1) に腹腔投与し、その 2 日後の夕方に hCG (ヒト胎盤性ゴナドトロピン) を腹腔投与した。これにつづき、8-20 週齢の雄マウス (C57BL/6) を 1 匹ずつゲージに入れ交配を開始した。交配の翌日の午前中に膣栓の検査を行い、膣栓が確認できた雌マウスを頸椎脱臼により屠殺後、輸卵管を単離し、ヒアルロニターゼ添加した Whitten 培養液に移した。実体顕微鏡下で卵を排出させ、受精卵の分離・洗浄を行った。

微分干渉装置 (ノマルスキー装置) 付きの倒立顕微鏡に、マニピュレータを組み合わせたシステムを用い、穴あきスライドガラス上の培養液滴に 5-30 個の受精卵を移動し、一つの受精卵あたり約 2,000 コピーの上記で調製した DNA 断片を含む 2 μ l の DNA 溶液を雄性前核にマイクロインジェクションした。DNA 注入が終了した卵は、卵管に移植するまで培養した。移植部位は胚の発生段階で異なり、1-2 細胞期の胚は卵管内へ、8 細胞期-胚盤胞期の胚は子宮内へ移植した。

胚移植操作に先立ち、レシピエントメスの黄体の活性化処理を行い、偽妊娠を誘起させた。すなわち、発情前期のメスを精管結紮したオスと不妊交尾させた。移植胚の出産予定日は、レシピエントメスの膣栓のついた日を第 1 日とし、第 20 日目として計算した。卵管内へ移植する場合は、1 細胞期および 2 細胞期の

胚とも、ネンブタール麻酔下で偽妊娠一日目のレシピエントマウスの卵管内に実体顕微鏡下で移植した。片側卵管あたり 10 個程度の胚を移植した。子宮内に移植する場合は、体外培養によって桑実胚期から胚盤胞期まで発生させた胚を、ネンブタール麻酔下の偽妊娠を誘起しておいたレシピエントマウスの子宮内に移植した。レシピエントマウスの偽妊娠日齢は胚の日齢よりも 1 日若く計算した。外見から胎仔の数を判断し、胎仔の数が 5 匹以上と予想された場合は自然分娩、4 匹以下ならば帝王切開を行った。生まれたマウスは、生後 3-4 週の間親から離し、雌雄を分けて飼育した。

[実施例 3] トランスジェニックマウスの選択

生後 4 週齢以降に尾の一部を切断し、キット (Qiagen tissue kit; Qiagen 社) を用いてゲノム DNA を抽出した。これを鋳型にして、導入遺伝子断片の PCR による増幅を行った。増幅には、CMV-F1 プライマー (5'-GTC GAC ATT GAT TAT TGA CTA G-3' / 配列番号 : 9) と CMV-R1 プライマー (5'-CCA TAA GGT CAT GTA CTG-3' / 配列番号 : 10)、 β -gl-3 プライマー (5'-CTT CTG GCG TGT GAC CGG CG-3' / 配列番号 : 11) と hM2-2 プライマー (5'-ATC GAA TTC TGA GAT CAT AAT CCC TGT GGG ATG C-3' / 配列番号 : 12)、および hM8-1 プライマー (5'-TTA TTC AGT GGC AAA GTT TCT TGC CCT TGA-3' / 配列番号 : 13) と β -globinR プライマー (5'-TCG AGG GAT CTT CAT AAG AGA AGA G-3' / 配列番号 : 14) の 3 対のプライマーを用い、3 対のプライマーによる PCR の全てで増幅産物が得られる個体を選別した。得られた F0 世代 6 個体 (雄 3 個体、雌 3 個体) を、正常個体 (C57BL/6N Jcl) と交配させ F1 世代を得、さらにヘテロの F1 同士を掛け合わせて F2 を得た。

[実施例 4] ヒト・メグシン遺伝子の発現解析 (1) ノーザンブロット解析

ヒト・メグシン遺伝子のノーザンブロット解析を、以下のようにして行った。ヒト・メグシン遺伝子をインサートとして含むベクター pBsCAG-2 の Bgl II/BamHI 断片をランダム DNA ラベリングによって RI 標識し、プローブとした。

この断片はベクターの poly A シグナル近辺に相当する。マウスの腎メサングウム細胞から抽出した全 RNA (10 μ g) を、2.2M ホルムアミドを含む 1%アガロースゲルで分離し、ニトロセルロースフィルターへ転写した。フィルターを Rapid Hyb 溶液 (Amersham 社, Arlington Heights, IL) 中でハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後に、55°C で、0.1 \times SSPE/0.1%SDS という最終ストリンジェンシーで洗浄した。実験に用いたマウスは、トランスジェニックマウスとして A1-14 (キメラ)、および F1-18 (F 1) を、また正常マウス (非トランスジェニックマウス) として A1-11 (A1-14 の同腹子)、および F1-19 (F 1) の 4 匹である。陰性対照(N.C.)には形質転換していない正常マウス(C57BL/6)を用いた。

得られた結果を図 2 に示した。トランスジェニックマウスの腎メサングウム細胞において、外来遺伝子であるヒト・メグシン遺伝子が発現していることが確認できた (レーン 2、および 4)。

[実施例 5] 抗ヒト・メグシン抗体の製造・精製

他のセルピンファミリーとの相同性が低く、かつ親水性を有する領域を免疫原として利用し、メグシントタンパク質に対するポリクローナル抗体を製造した。具体的には、ヒト・メグシンを構成するアミノ酸配列 (配列番号: 2) から、次のアミノ酸配列を免疫原として選択した。

N 末端からの位置: 72-86

アミノ酸配列: SQSGLQSQLKRVFSD

配列番号: 1 5

ペプチド名: P₂

上記アミノ酸配列の N 末端に C を付加したペプチドを、自動合成装置モデル 432A(Perkin Elmer, Foster City, CA)で合成した。合成ペプチドは逆相 HPLC で精製後、凍結乾燥して、免疫および、免疫学的特異性の確認のための競合実験に用いた。

合成ペプチドとウシチログロブリン（シグマ社製）を N-(6-maleimidocaproyloxy) succinimide（同仁化学研究所製）を用いて結合させ、0.85% NaCl 溶液にて透析後、アジュバント（Difco 製）と充分混和し乳化させ、ウサギ皮下に投与した。初回免疫（20 μ g/羽）後 3 週間後に 2 回目（50 μ g/羽）の免疫を行い、以後 2 週間毎に 4 回免疫（50、100、200 μ g/羽）を行った。アジュバントは初回のみフロイド完全アジュバントで、2 回目以降はフロイド不完全アジュバントを用いた。41 日後、55 日後、採血で得た血清が合成ペプチドと反応することを確認するため、血清の抗体価を酵素免疫測定法（ELISA）により評価した。抗原 50 ng/well を固相化した 96 穴プレートに連続的に希釈した抗血清を各ウエルに 100 μ L 加えて一次反応を行い、洗浄後、二次反応として HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG（カッヘルプロダクト製）を反応させた。洗浄後、基質としてオルトフェニレンジアミン（和光純薬製）を用い発色させ吸光度 492 nm で測定し、抗体価が上昇していることを確認した。

メグシンタンパク質の合成ペプチド P₂ に対するポリクローナル抗体は、公知の方法（細胞工学別冊 実験プロトコルシリーズ 抗ペプチド抗体実験プロトコル、秀潤社）に従ってイムノアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。操作は、次のとおりである。合成ペプチドを FMP（2-fluoro-1-methylpyridinium toluene-4-sulfonate）活性化セルロファイン（生化学工業製）に固定化し、アフィニティーカラムを作製した。抗体は、メグシンタンパク質を免疫し抗体価の上昇したウサギ血清を PBS（-）で希釈したのち、ペプチドカラムを用いてアフィニティー精製した。得られた精製抗体はウエスタンブロットによりメグシンタンパク質融合タンパク質と反応することを確認し、メグシンタンパク質に特異的であることを証明した。

〔実施例 6〕 ヒト・メグシン遺伝子の発現解析（2） イムノブロット解析

ヒト・メグシントタンパク質のイムノブロット解析を、以下のようにして行った。腎臓組織 (10mg) をサンプルバッファー (0.35M トリス-HCl (pH 6.8)、10% SDS、36% グリセロール、5% β -メルカプトエタノール、0.012% ブロモフェノールブルー) 100 μ l 中でホモジナイズし、5000 g で 15 分間遠心した。上清中のタンパク質を 5 分間煮沸して変性させ、10% アクリルアミドゲル上で SDS-PAGE により分離したのち、電気泳動的にポリフッ化ビニリデン膜 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) に移した。この膜を 0.5% Tween 20、2% ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水により 4°C で一晩ブロッキングし、ウサギ抗ヒト・メグシン IgG (10 μ g/ml) とインキュベートした。次に、この膜を 0.05% Tween 20 を含む PBS で洗浄したのち、1:5000 に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (Cappel 社、Durham, NC) とインキュベートし、p-ニトロブルー塩化テトラゾリウム (p-nitro blue tetrazolium chloride) / 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) 溶液 (Bio Rad Laboratories) で発色させた。陽性対照として、大腸菌で発現させたマルトース結合タンパク質・メグシン融合タンパク質 (MBP-メグシン) を用いた。

図 3 に示すように、トランスジェニックマウスの腎臓においてヒト・メグシントタンパク質が発現していることが確認できた (レーン 3、および 5)。

〔実施例 7〕ヒト・メグシン遺伝子の発現解析 (3) 免疫組織染色 (イムノヒストケミスト)

トランスジェニックマウスから腎臓組織を採取した。腎臓組織は、凍結組織包埋剤 (O. C. T. compound、Tissue Tek Miles 社、Elkhart, IN) に包埋し、ドライアイス/アセトンで瞬時に凍結した。この凍結包埋組織から 4 μ m の凍結切片を作製した。この凍結切片を 4% のスキムミルクにより室温で 60 分間ブロッキングしたのち、ウサギ抗ヒト・メグシン IgG (10 μ g/ml)、あるいは 1:200 に希釈したフルオレッセインイソチオシアネート (FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG、

IgA、IgM、または C3 抗体 (Cappel 社) のいずれかと 4℃で一晩インキュベートした。ついで、1:50 に希釈したペルオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギ抗体 (Dako 社、Glostrup, Denmark) と室温で 20 分間インキュベートし、0.03%の過酸化水素水を含む 3,3'-ジアミノベンジジン溶液で発色させた。その後、ヘマトキシリンによる対比染色を行った。

トランスジェニックマウスの腎臓組織に対して免疫組織染色した顕微鏡写真 (Carl Zeiss(New York, NY)製 Zeiss Ortholux 9902) を図 4 に示す。図から明らかなように、トランスジェニックマウスの腎臓ではメグシタンパク質が一樣に発現していることが確認された。

〔実施例 8〕メグシン・トランスジェニックマウスの病理解析 (1) PAS 染色による観察と定量化

実施例 3 で得られた F1 世代のトランスジェニックマウスの病理解析を行った。これらのマウスは外見上、正常マウスに比べ明らかな変化は見られなかった。また、行動も正常マウスと違いは認められなかった。また、剖検によっても、腎臓 (後述) 以外に著変は見られなかった。主要臓器の組織切片 (HE 染色) の観察によっても、腎臓以外に特に異常は見られなかった。

各トランスジェニックマウスの腎臓の PAS 染色により、メサンギウム基質の面積およびメサンギウム細胞数の変化などの解析を行った。F1 (ヘテロ) 個体では、10 週目まで著変はなかったが、36-40 週目にかけてメサンギウム細胞を主体とした細胞増殖、メサンギウム基質の増生が認められ、増殖性腎炎像が観察された。このときの腎臓の PAS 染色像を図 5 に示す。糸球体肥大、メサンギウム細胞の増加、メサンギウム基質の増生を含む、メサンギウム細胞増殖性腎炎の典型的な所見が見られた。

これらの観察結果を以下のように定量化した。PAS 染色像を 3CCD カメラ (オリンパス、Tokyo, Japan) でスキャンし、糸球体全体の大きさと糸球体あたりのメサンギウム細胞の数とをソフトウェア: Image Grabber PCI (富士フィルム、

Tokyo, Japan) および Mac Aspect (Mitani, Tokyo, Japan) により測定した。糸球体の大きさは糸球体を形成する毛細血管の外束を囲んで生じる領域の面積として定義した。皮質中層部に存在する 20 個の糸球体を同定し、測定した。20 個未満の糸球体しか含まない切片は測定に用いなかった。測定者によって測定値がばらつくのを避けるために、20 個の糸球体のうち、最大および最小のものを測定から除外した。つまり、切片ごとに 18 個の糸球体を測定し、測定値を平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した。有意差を評価するために、分散分析 (ANOVA) を行った。その結果として、もし、有意差が認められたら、Scheffe の t-テストを行い、トランスジェニックマウス、および野生型マウスそれぞれについて得られた結果を比較した。

野生型マウス 25 匹について測定を行い、トランスジェニックマウスの測定値が野生型マウスの平均値 $+2SD$ 以下の場合には正常であると見なした。この基準に従うと、生後 20 週目の F1 (ヘテロ) トランスジェニックマウスでは、14 匹のうち、3 匹が変化を示したが、40 週目では、19 匹のうち、11 匹 (57.9%) について糸球体の大きさが増加し、12 匹 (63.2%) について糸球体細胞の数が増加した (図 6)。合わせると、14 匹 (73.0%) が組織学的に糸球体の異常を示した。このような疾患の重篤度 (severity)、および浸透率 (penetrance) は性別によらず一定であった。また、これまでに調べた他の器官、例えば、脳、心臓、肺、脾臓、肝臓、胃、腸、精巣、および子宮においては病理学的な変化は検出されなかった。野生型マウスでは、40 週目にメサングウム基質の増生を示した 1 匹を除き、病理学的な変化は観察されなかった。

〔実施例 9〕メグシン・トランスジェニックマウスの病理解析 (2) 免疫複合体沈着の観察

腎臓が異常を示すようになる 40 週齢目のトランスジェニックマウス (F1 世代) において、免疫グロブリン (IgA, IgG, IgM) や補体から成る免疫複合体の

糸球体メサンギウム領域への沈着が同週齢の野生型マウスの場合に比べて著しく増大するのが免疫蛍光染色により示された（図7）。

上記の組織に対して電子顕微鏡による解析を行った。腎組織を、2% グルタルアルデヒドを含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液中に 2 時間浸して固定し、さらに 2% 四酸化オスミウムで後固定した。固定した腎組織をエタノールで脱水し、最終的に Epon 812 (TAAB, England) 中に包埋した。この試料から切り出した超薄切片を酢酸ウラニルで染色し、アセトンで処理したのち、電子顕微鏡 (JEM-1200EX, JEOL, Tokyo, Japan) により解析した。

その結果、非トランスジェニックマウスではメサンギウム領域における高電子密度の沈着物が少数観察されるのみだったのに対し、トランスジェニックマウスでは高電子密度の沈着物は著しく増加しており、その大きさは 100~1000nm におよんだ（図8）。トランスジェニックマウスのメサンギウム領域における異常はメサンギウム細胞数の増加、およびメサンギウム基質の増生によるものであった。病理的な異常はメサンギウム領域に限られており、毛細血管内皮は概して正常な外観を示し、内皮細胞の有窓性 (fenestration) は維持されていた。糸球体上皮細胞は足突起 (foot process) の正常な形態的特徴を維持しており、無傷であった。皮質尿細管も正常な外観を示した。単核白血球、または多形核白血球の浸潤は検出されなかった。

〔実施例 10〕 ノーザンブロット分析によるトランスジェニックマウス各種臓器におけるヒトメグシン発現の確認

全 RNA を ISOGEN (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) を用いて、凍結腎臓や各種組織より迅速に単離した。RNA 20 μ g を 1% アガロースホルムアルデヒドゲル上で電気泳動し、ナイロンメンブレン (GeneScreen Plus™) にキャピラリートランスファーした。転写した RNA は、³²P 標識した導入ヒトメグシン遺伝子とハイブリダイズさせ、オートラジオグラフィーの前に 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む 0.2×SSC で洗浄した。

ノーザンブロット分析から、トランスジェニックマウスにおいてヒトメグシン mRNA の過剰発現が確認された（図 9）。導入遺伝子はあらゆる組織で発現していたが、特に腎臓および心臓において強い発現が見られた。トランスジェニックマウスにおけるヒトメグシン cDNA の発現は、着床前段階で始まり、40 週齢後まで続いた。

〔実施例 11〕免疫組織化学分析による IV 型コラーゲン及びラミニンの蓄積の確認

増生した基質の成分を同定するために、以下の抗体を用いて、凍結切片に免疫組織染色法(Nangaku, M. et.al., J. Am. Soc. Nephrol. 10, 2323-2331, 1999)を施行した。IV 型コラーゲンと I 型コラーゲンは、それぞれ、ヤギ抗 IV 型コラーゲン・ポリクローナル抗体、およびヤギ抗 I 型コラーゲン・ポリクローナル抗体 (Southern Biotechnology, Birmingham, AL)で同定した。フィブロネクチンはウサギ抗フィブロネクチン抗体(Chemicon)で確認した。

上記の細胞外メサンギウム基質成分に対する抗体を用いて腎臓部分を染色した結果を図 10 に示した。野生型及びトランスジェニックマウス両方で、I 型コラーゲンの蓄積は観察されなかった。トランスジェニックマウスでは、糸球体において、IV 型コラーゲンおよびラミニンの蓄積を示した。対照的にトランスジェニックマウスでは、フィブロネクチンの量が野生型マウスと比較してより少なかった。つまり、増大したメサンギウム基質は IV 型コラーゲンおよびラミニンから構成されていることが明らかになった。

正常な状態ではメグシンは糸球体メサンギウム領域に局在するが、トランスジェニックマウスにおいては全ての組織においてメグシンの発現が見られた。これは、遺伝子導入に用いたプロモーターが、組織特異性の無いものであったことによるものと考えられる。免疫組織学的な検討によれば、腎臓のメサンギウム領域以外の領域を含む、宿主動物の全身におけるメグシンの存在が観察された。ところが、メグシンの過剰発現による影響はメサンギウムに限局されていた。この知

見は、メサンギウムに局在しているメグシンの標的分子（メグシン・リガンド）の存在を示唆する点で、非常に興味深い。つまり、メグシンの活性発現には、この領域にのみ存在するリガンドの存在が必要であることが考えられる。いずれにせよ、メサンギウムにおけるメグシンの強制発現によって、メサンギウム増殖性腎炎の典型的な病態がもたらされることが明らかとなった。

以上の結果が示すとおり、ヒトメグシン遺伝子導入トランスジェニックマウスでは、メサンギウム基質の増生とメサンギウム細胞の増加が観察された。メサンギウム基質の増生は、IV型コラーゲンとラミニンによるものであった。また障害を受けた糸球体には、免疫グロブリンと補体を含む免疫複合体が集積していた。

メグシンの強制発現によって、病態をより忠実に反映したメサンギウムの損傷がもたらされた。これらの結果は、メグシントランスジェニックマウスが、腎機能の保持と、メサンギウム損傷の進行を調節可能な薬剤研究のモデルとして利用できることを裏付けている。また本発明のメサンギウム増殖性腎炎モデル動物を通じて、メグシンに基づいてヒト糸球体疾患の病態を理解できる可能性がある。

産業上の利用の可能性

本発明により、メグシン遺伝子の導入によるメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物が提供された。本発明のトランスジェニック動物に特徴的な病理像としては、メサンギウムおよび糸球体内皮細胞領域の細胞増殖と細胞外基質の蓄積を慢性進行性に呈する点を挙げることができる。このような病理所見は、本発明のモデル動物がよりヒトの慢性糸球体腎炎に近い病態を呈していることを裏付けている。したがって、慢性糸球体腎炎の原因解明に役立つものと考えられる。このような病理所見は従来のモデル動物では確認されていなかったものである。

本発明のモデル動物を用いて、メサンギウム細胞増殖性腎炎の発症メカニズムや病態の解析が可能になる。また、本発明のモデル動物は、メサンギウム細胞増

殖性腎炎の治療薬の開発やスクリーニング、さらには薬剤の検定などのために有用である。

本発明のメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物は、トランスジェニック動物であるため、均一性の高いモデル動物を容易に、しかも多量に供給できることから、精度の高い実験を可能とするものである。しかも、本発明のメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物により、メサンギウム基質領域の増生、メサンギウム細胞の増加、そして免疫複合体の沈着を伴う典型的なメサンギウム細胞増殖性腎炎の所見が認められた。特に、このような実際の病態に忠実なモデル動物が提供された本発明の意義は、非常に大きい。

請求の範囲

1. ヒト・メグシン、またはヒト・メグシンと機能的に同等なタンパク質をコードする外来性の DNA を腎メサンギウム細胞において発現するトランスジェニック非ヒト動物であるメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物。
2. ヒト・メグシンをコードする DNA が、配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域からなる請求項 1 に記載のメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物。
3. 非ヒト動物がマウスである請求項 1 に記載のメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物。
4. ヒト・メグシン、またはヒト・メグシンと機能的に同等なタンパク質をコードする DNA と、この DNA を動物の腎メサンギウム細胞において発現させることができるプロモーターとを含むメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物作製用組み換え遺伝子。
5. 次の工程を含む、メサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物の作製方法。
 - a) 動物の受精卵に請求項 4 に記載の組み換え遺伝子を導入する工程
 - b) 工程 a) の受精卵から発生した初代トランスジェニック動物のうち導入した外来性遺伝子を保持した個体を選択する工程
6. 更に次の工程 c) および d) を含む請求項 5 に記載のメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物の作製方法。
 - c) 工程 b) で選択した個体と正常動物を交配させて外来性遺伝子をヘテロで保有する F 1 動物を得る工程
 - d) 工程 c) で得た F 1 動物同士を交配させて外来性遺伝子をホモで保有する F 2 動物を得る工程
7. 次の工程を含む、メサンギウム細胞増殖性腎炎に対する候補化合物の治療効果を評価する方法。
 - a) 請求項 1 に記載のメサンギウム細胞増殖性腎炎モデル動物に候補化合物

を投与する工程、

b) 前記モデル動物における腎炎症状の変化を観察する工程

8. 次の工程を含む、メサングウム細胞増殖性腎炎治療用の化合物をスクリーニングする方法。

a) 請求項 1 に記載のメサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物に候補化合物を投与する工程、

b) 前記モデル動物における腎炎症状の変化を観察する工程

c) メサングウム細胞増殖性腎炎モデル動物の腎炎症状を緩和する化合物を選択する工程

9. 請求項 8 に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を主成分として含む、メサングウム細胞増殖性腎炎の治療、および／または予防用医薬組成物。

図 1

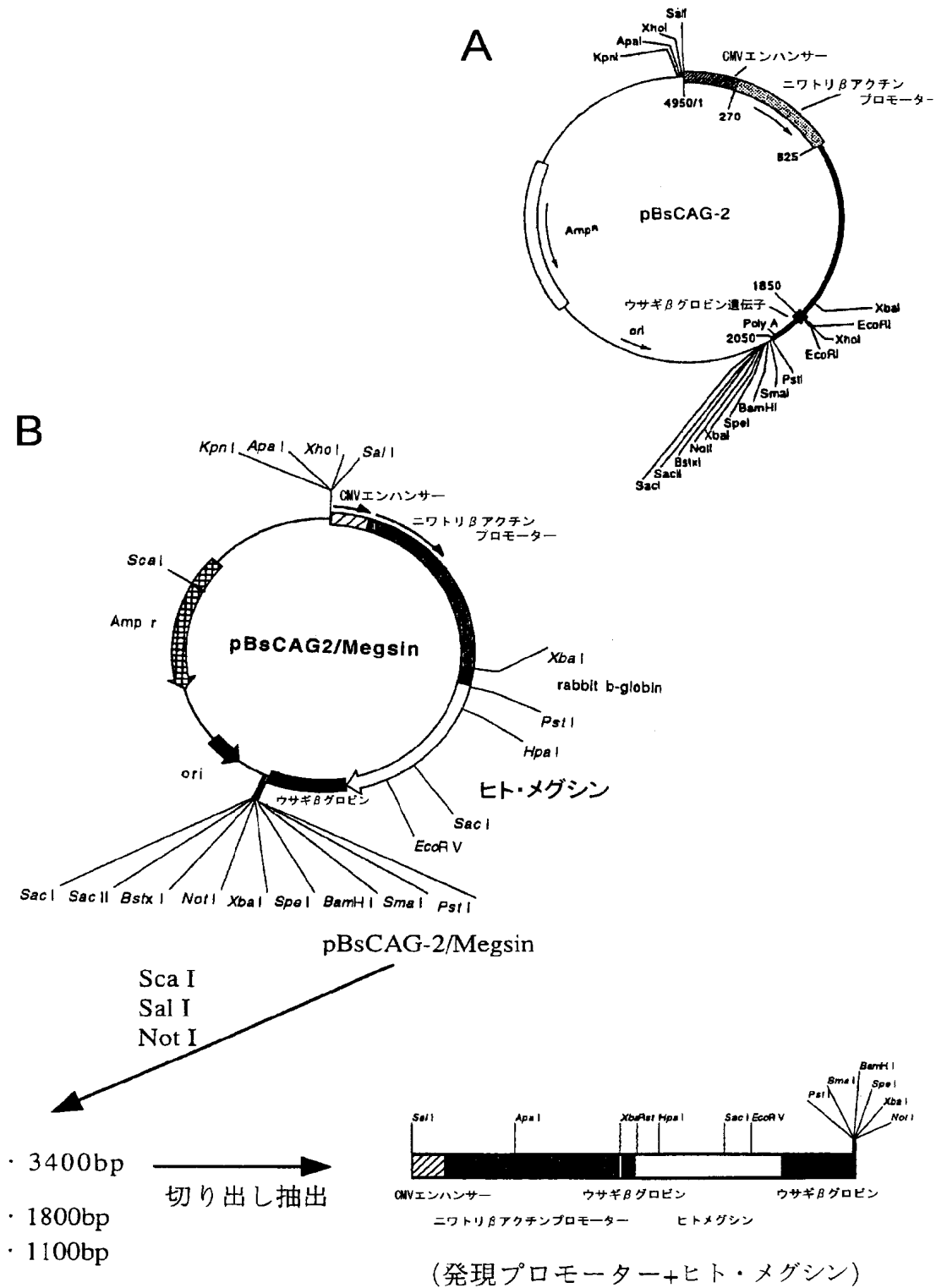
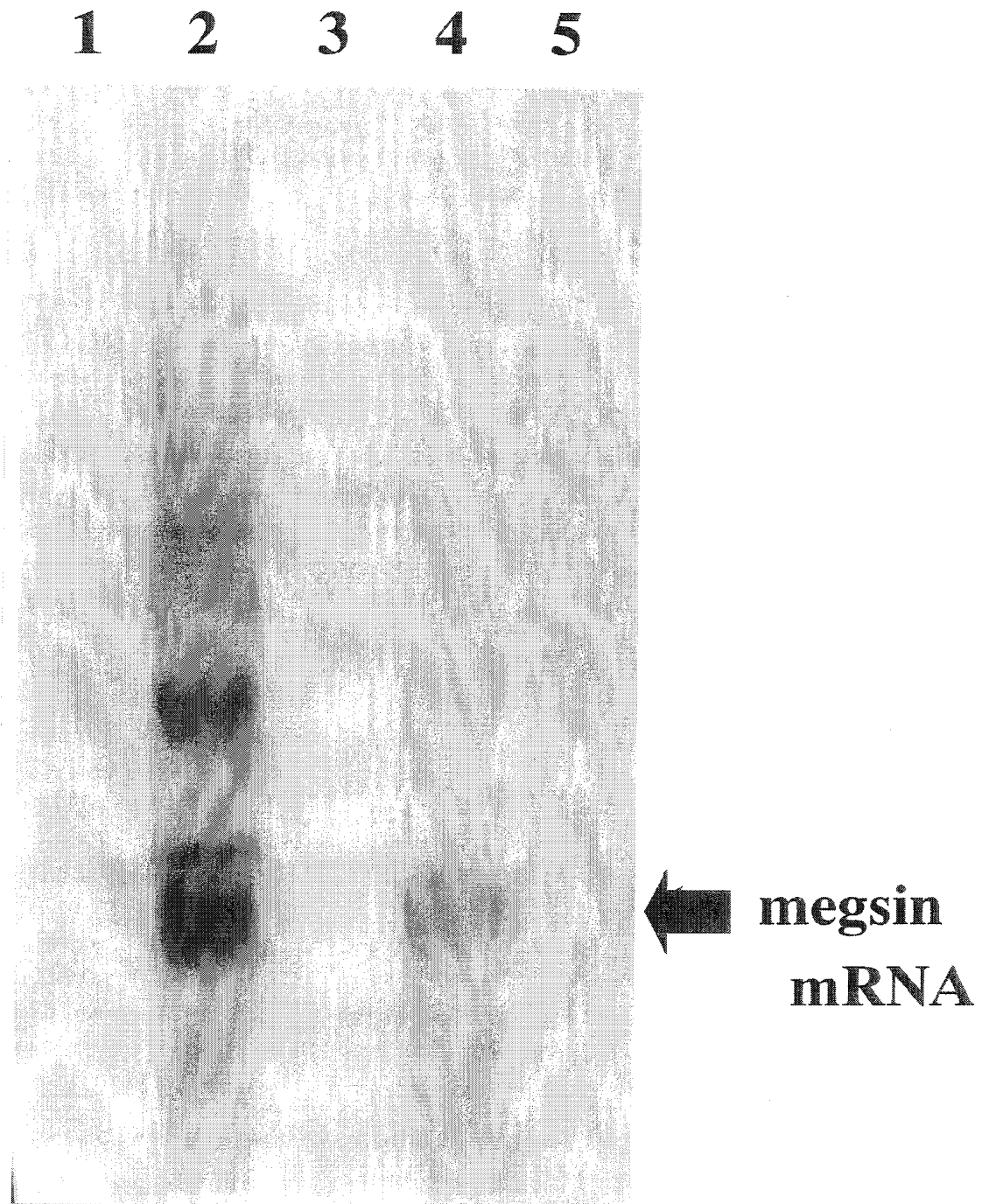
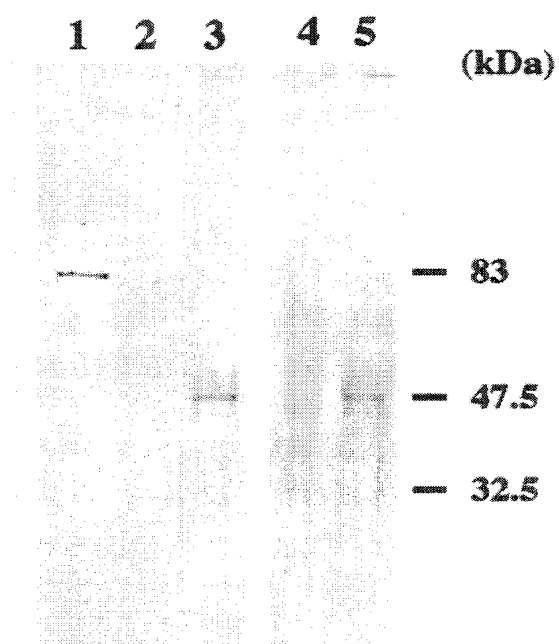


図 2



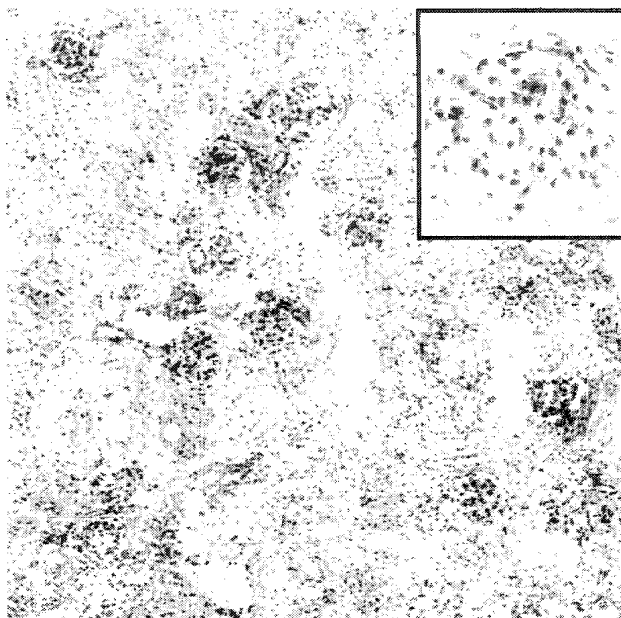
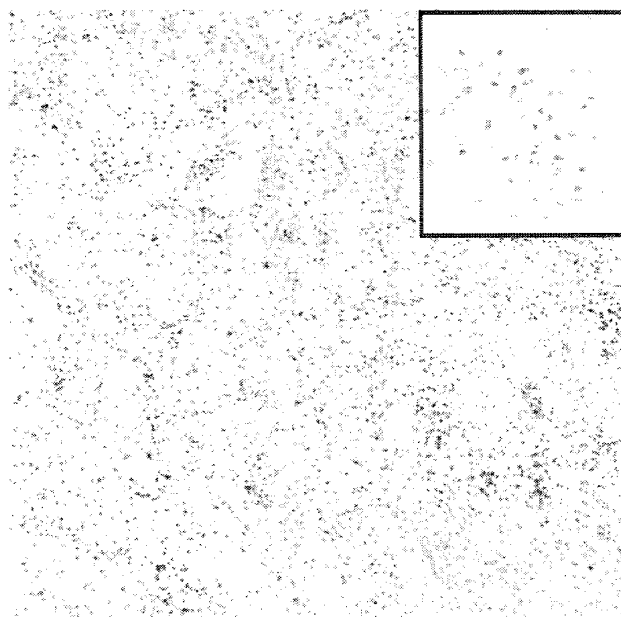
3/10

☒ 3



4/10

図 4

a**b**

5/10

図 5

メグシントランスジェニックマウス (ヘテロ)
($\times 50$) ($\times 200$)

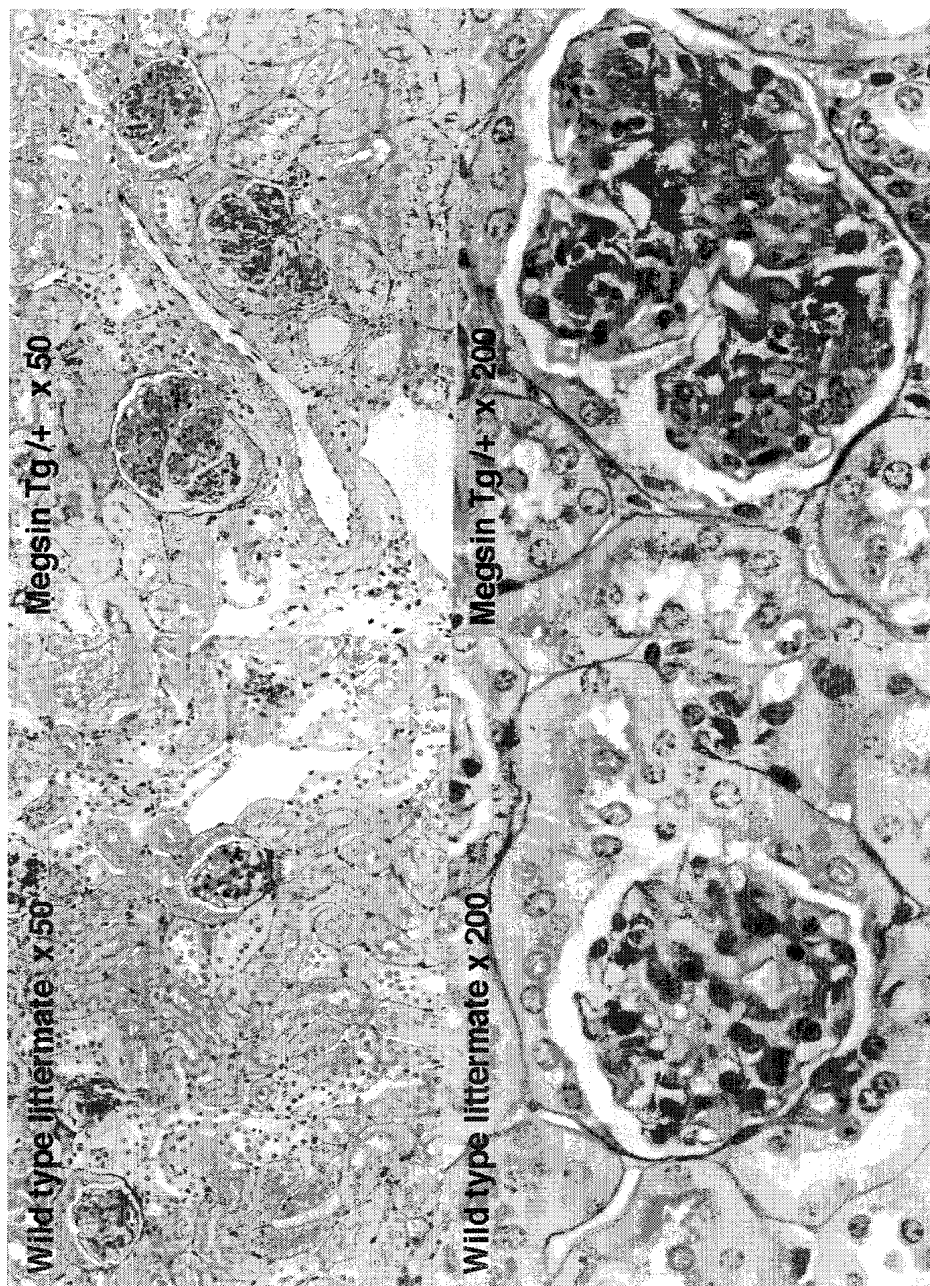
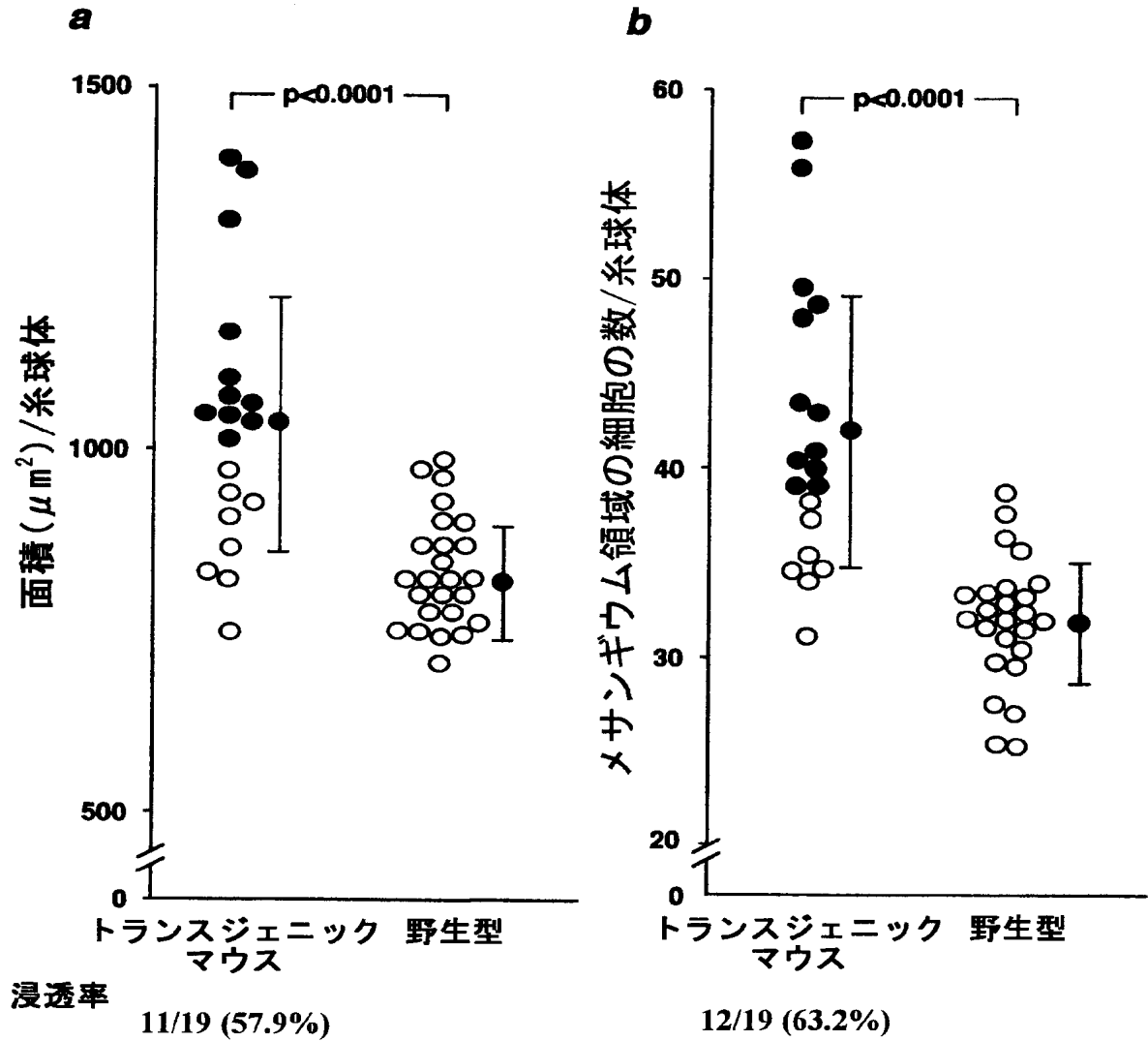
野生型 ($\times 50$)野生型 ($\times 200$)

図 6



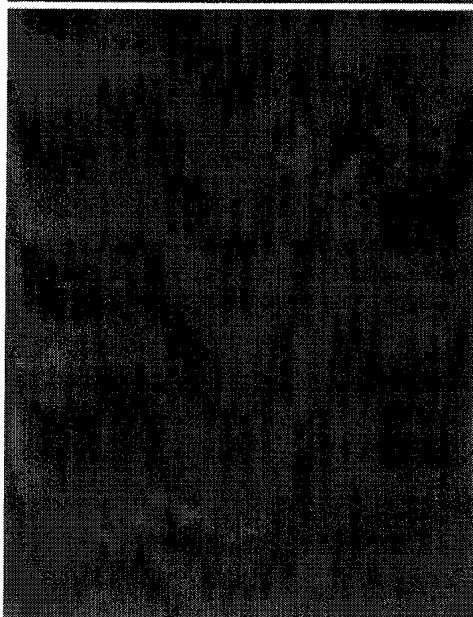
7/10

図 7

a



b



☒ 8

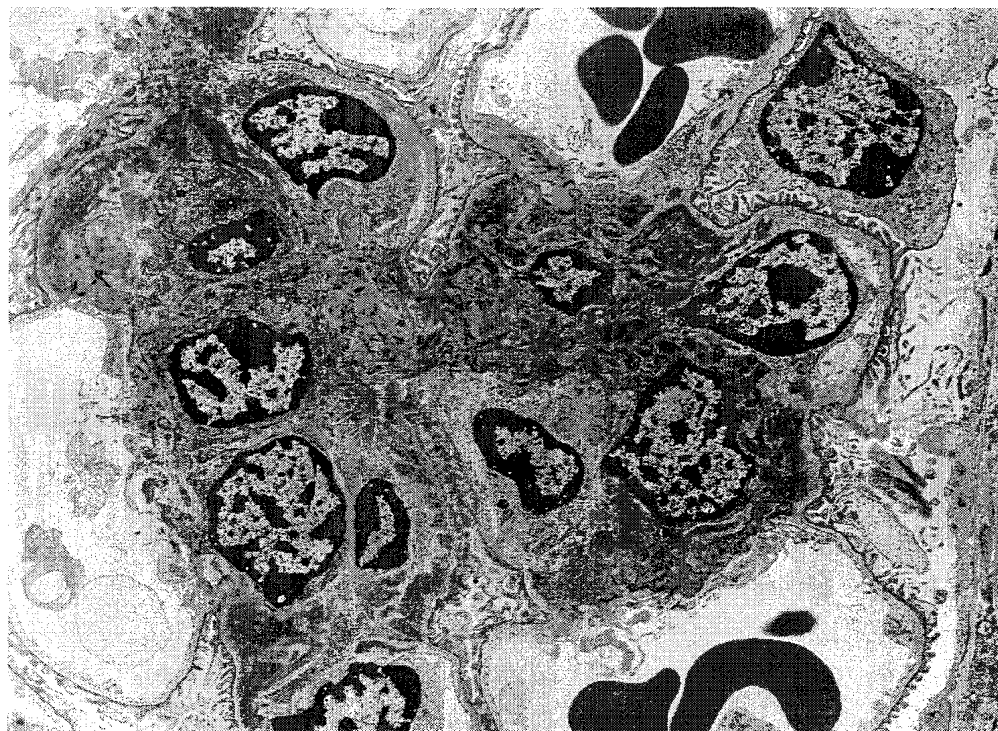
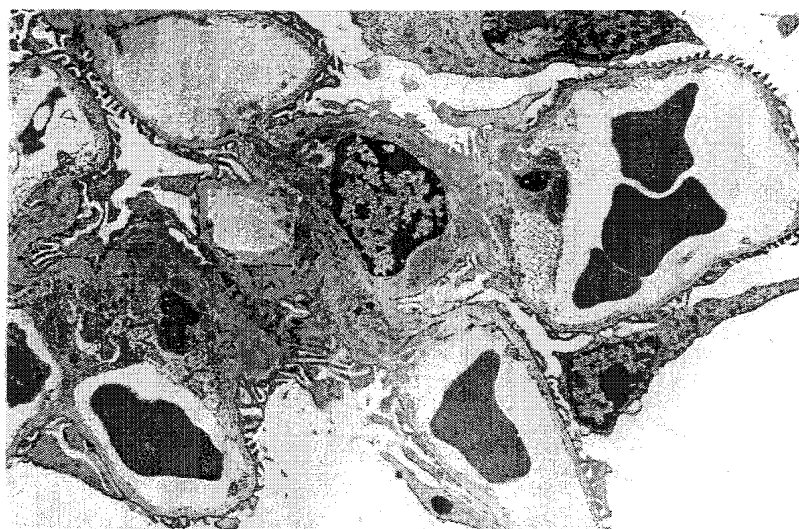
a**b**

図 9

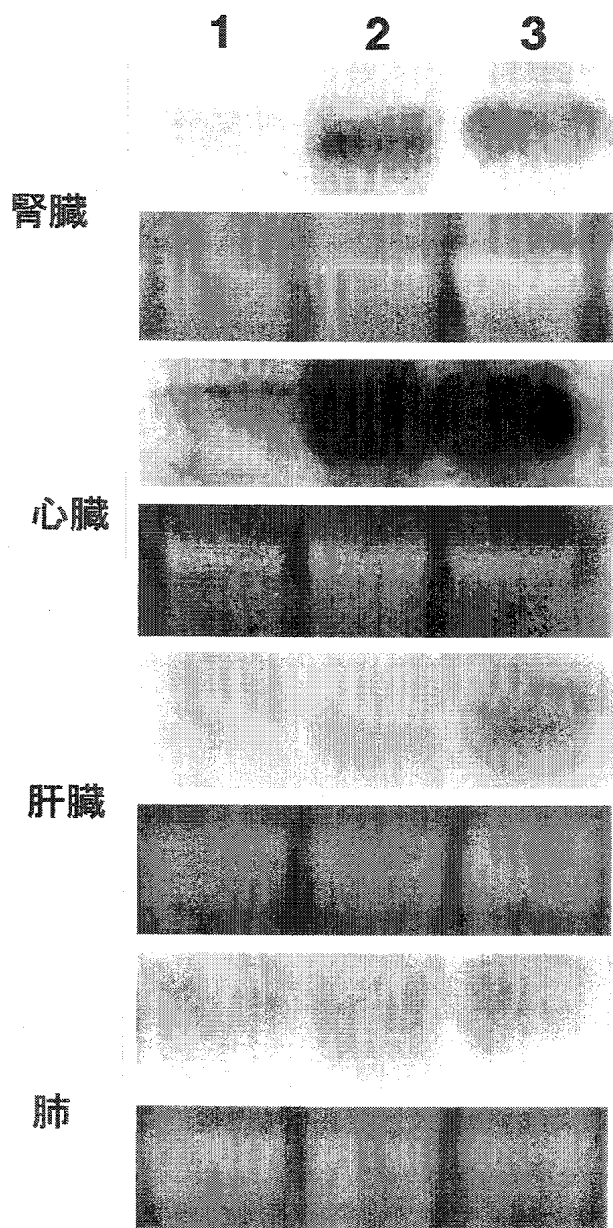
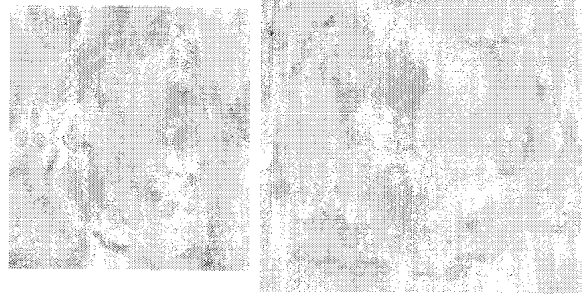
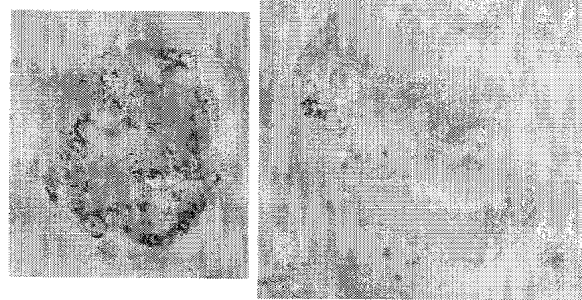


図 10

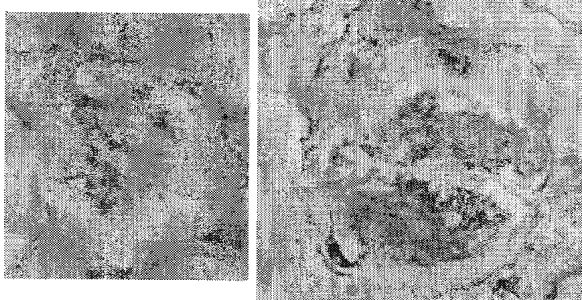
I型コラーゲン



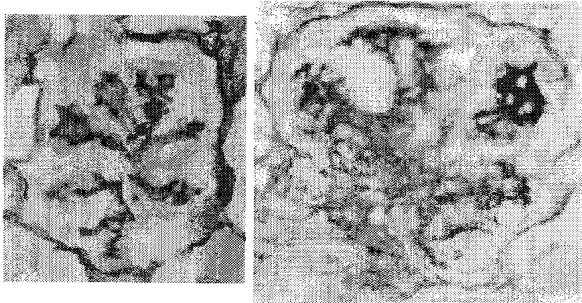
フィブロネクチン



ラミニン



IV型コラーゲン



SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, Toshio
KUROKAWA, Kiyoshi

<120> Model animals of nephropathy proliferating mesangial
cells

<130> KRK-108PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-285736

<151> 1999-10-06

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1143

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1140)

<400> 1

| | |
|---|-----|
| atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gag ttt tgc ttc aac ctg ttc | 48 |
| Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe | |
| 1 5 10 15 | |
| aga gag atg gat gac aat caa gga aat gga aat gtg ttc ttt tcc tct | 96 |
| Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser | |
| 20 25 30 | |
| ctg agc ctc ttc gct gcc ctg gcc ctg gtc cgc ttg ggc gct caa gat | 144 |
| Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp | |
| 35 40 45 | |
| gac tcc ctc tct cag att gat aag ttg ctt cat gtt aac act gcc tca | 192 |
| Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser | |
| 50 55 60 | |
| gga tat gga aac tct tct aat agt cag tca ggg ctc cag tct caa ctg | 240 |
| Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu | |

2/15

| 65 | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | | | |
|---|---------------------------------|--|--|--|--|-------------------------|--|--|--|--|-------------------------|--|--|--|--|-----|
| aaa aga gtt ttt tct gat ata aat gca tcc cac aag gat tat gat ctc | Lys Arg Val Phe Ser 85 | | | | | Ala Ser 90 | | | | | Tyr Asp 95 | | | | | 288 |
| agc att gtg aat ggg ctt ttt gct gaa aaa gtg tat ggc ttt cat aag | Ser Ile Val Asn Gly 100 | | | | | Leu Phe Ala Gly 105 | | | | | Val Tyr Gly Phe 110 | | | | | 336 |
| gac tac att gag tgt gcc gaa aaa tta tac gat gcc aaa gtg gag cga | Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu 115 | | | | | Leu Tyr Asp Ala 120 | | | | | Val Glu Arg 125 | | | | | 384 |
| gtt gac ttt acg aat cat tta gaa gac act aga cgt aat att aat aag | Val Asp Phe Thr Asn His 130 | | | | | Leu Glu Asp Thr Arg 135 | | | | | Arg Asn Ile Asn 140 | | | | | 432 |
| tgg gtt gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aac gtg att ggt gaa | Trp Val Glu Asn Glu Thr 145 | | | | | His Gly Lys Ile 150 | | | | | Val Ile Glu 160 | | | | | 480 |
| ggt ggc ata agc tca tct gct gta atg gtg ctg gtg aat gct gtg tac | Gly Gly Ile Ser 165 | | | | | Ala Val Met Val 170 | | | | | Val Asn Ala Val 175 | | | | | 528 |
| ttc aaa ggc aag tgg caa tca gcc ttc acc aag agc gaa acc ata aat | Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser 180 | | | | | Ala Phe Thr Lys Ser 185 | | | | | Glu Thr Ile Asn 190 | | | | | 576 |
| tgc cat ttc aaa tct ccc aag tgc tct ggg aag gca gtc gcc atg atg | Cys His Phe Lys Ser Pro 195 | | | | | Cys Ser Gly Lys Ala 200 | | | | | Val Ile Glu Asp 205 | | | | | 624 |
| cat cag gaa cgg aag ttc aat ttg tct gtt att gag gac cca tca atg | His Gln Glu Arg Lys Phe 210 | | | | | Asn Leu Ser Val Ile 215 | | | | | Glu Asp Pro Ser 220 | | | | | 672 |
| aag att ctt gag ctc aga tac aat ggt ggc ata aac atg tac gtt ctg | Lys Ile Leu Glu Leu Arg 225 | | | | | Tyr Asn Gly Gly Ile 230 | | | | | Asn Met Tyr Val 235 | | | | | 720 |
| ctg cct gag aat gac ctc tct gaa att gaa aac aaa ctg acc ttt cag | Leu Pro Glu Asn Asp 245 | | | | | Leu Ser Glu Ile Glu 250 | | | | | Asn Lys Leu Thr Phe 255 | | | | | 768 |
| aat cta atg gaa tgg acc aat cca agg cga atg acc tct aag tat gtt | Asn Leu Met Glu Trp Thr 816 | | | | | Asn Pro Arg Arg Met 816 | | | | | Thr Ser Lys Tyr Val 816 | | | | | 816 |

3/15

| 260 | | | | | | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|--|--|--|
| gag | gta | ttt | ttt | cct | cag | ttc | aag | ata | gag | aag | aat | tat | gaa | atg | aaa | 864 | | | | |
| Glu | Val | Phe | Phe | Pro | Gln | Phe | Lys | Ile | Glu | Lys | Asn | Tyr | Glu | Met | Lys | | | | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | | | | |
| caa | tat | ttg | aga | gcc | cta | ggg | ctg | aaa | gat | atc | ttt | gat | gaa | tcc | aaa | 912 | | | | |
| Gln | Tyr | Leu | Arg | Ala | Leu | Gly | Leu | Lys | Asp | Ile | Phe | Asp | Glu | Ser | Lys | | | | | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | | | | |
| gca | gat | ctc | tct | ggg | att | gct | tcg | ggg | ggt | cgt | ctg | tat | ata | tca | agg | 960 | | | | |
| Ala | Asp | Leu | Ser | Gly | Ile | Ala | Ser | Gly | Gly | Arg | Leu | Tyr | Ile | Ser | Arg | | | | | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | | | | |
| atg | atg | cac | aaa | tct | tac | ata | gag | gtc | act | gag | gag | ggc | acc | gag | gct | 1008 | | | | |
| Met | Met | His | Lys | Ser | Tyr | Ile | Glu | Val | Thr | Glu | Glu | Gly | Thr | Glu | Ala | | | | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | | | | |
| act | gct | gcc | aca | gga | agt | aat | att | gta | gaa | aag | caa | ctc | cct | cag | tcc | 1056 | | | | |
| Thr | Ala | Ala | Thr | Gly | Ser | Asn | Ile | Val | Glu | Lys | Gln | Leu | Pro | Gln | Ser | | | | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | | | |
| acg | ctg | ttt | aga | gct | gac | cac | cca | ttc | cta | ttt | gtt | atc | agg | aag | gat | 1104 | | | | |
| Thr | Leu | Phe | Arg | Ala | Asp | His | Pro | Phe | Leu | Phe | Val | Ile | Arg | Lys | Asp | | | | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | | | | |
| gac | atc | atc | tta | ttc | agt | ggc | aaa | gtt | tct | tgc | cct | tga | | | | 1143 | | | | |
| Asp | Ile | Ile | Leu | Phe | Ser | Gly | Lys | Val | Ser | Cys | Pro | | | | | | | | | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | | | | |

<210> 2

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ser | Leu | Ala | Ala | Ala | Asn | Ala | Glu | Phe | Cys | Phe | Asn | Leu | Phe |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Glu | Met | Asp | Asp | Asn | Gln | Gly | Asn | Gly | Asn | Val | Phe | Phe | Ser | Ser |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Leu | Phe | Ala | Ala | Leu | Ala | Leu | Val | Arg | Leu | Gly | Ala | Gln | Asp |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ser | Leu | Ser | Gln | Ile | Asp | Lys | Leu | Leu | His | Val | Asn | Thr | Ala | Ser |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |

Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu
 65 70 75 80
 Lys Arg Val Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu
 85 90 95
 Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg
 115 120 125
 Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys
 130 135 140
 Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu
 145 150 155 160
 Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr
 165 170 175
 Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser Glu Thr Ile Asn
 180 185 190
 Cys His Phe Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys Ala Val Ala Met Met
 195 200 205
 His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val Ile Glu Asp Pro Ser Met
 210 215 220
 Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu
 225 230 235 240
 Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln
 245 250 255
 Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val
 260 265 270
 Glu Val Phe Phe Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys
 275 280 285
 Gln Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys
 290 295 300
 Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg
 305 310 315 320

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Met | His | Lys | Ser | Tyr | Ile | Glu | Val | Thr | Glu | Glu | Gly | Thr | Glu | Ala |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Thr | Ala | Ala | Thr | Gly | Ser | Asn | Ile | Val | Glu | Lys | Gln | Leu | Pro | Gln | Ser |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| Thr | Leu | Phe | Arg | Ala | Asp | His | Pro | Phe | Leu | Phe | Val | Ile | Arg | Lys | Asp |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Asp | Ile | Ile | Leu | Phe | Ser | Gly | Lys | Val | Ser | Cys | Pro | | | | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |

```
<210> 3
<211> 1229
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
```

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(1147)

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <400> 3 | | | | | | | | | | | | | | | 49 | |
| tttcaaa | atg | gcc | tcc | ctt | gct | gca | gca | aat | gca | gaa | ttt | ggc | ttc | gac | | |
| | Met | Ala | Ser | Leu | Ala | Ala | Ala | Asn | Ala | Glu | Phe | Gly | Phe | Asp | | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | |
| tta | ttc | aga | gag | atg | gat | agt | agt | caa | gga | aac | gga | aat | gta | ttc | ttc | 97 |
| Leu | Phe | Arg | Glu | Met | Asp | Ser | Ser | Gln | Gly | Asn | Gly | Asn | Val | Phe | Phe | |
| 15 | | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| tct | tcc | ctg | agc | atc | ttc | act | gcc | ctg | agc | cta | atc | cgt | ttg | ggt | gct | 145 |
| Ser | Ser | Leu | Ser | Ile | Phe | Thr | Ala | Leu | Ser | Leu | Ile | Arg | Leu | Gly | Ala | |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | |
| cga | ggt | gac | tgt | nnn | cgt | cag | att | gac | aag | gcc | ctg | cac | ttt | atc | tcc | 193 |
| Arg | Gly | Asp | Cys | Xaa | Arg | Gln | Ile | Asp | Lys | Ala | Leu | His | Phe | Ile | Ser | |
| | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | |
| cca | tca | aga | caa | ggg | aat | tca | tcg | aac | agt | cag | cta | gga | ctg | caa | tat | 241 |
| Pro | Ser | Arg | Gln | Gly | Asn | Ser | Ser | Asn | Ser | Gln | Leu | Gly | Leu | Gln | Tyr | |
| | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | |
| caa | ttg | aaa | aga | gtt | ctt | gct | gac | ata | aac | tca | tct | cat | aag | gat | nnn | 289 |
| Gln | Leu | Lys | Arg | Val | Leu | Ala | Asp | Ile | Asn | Ser | Ser | His | Lys | Asp | Xaa | |
| | 80 | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | |

6/15

| | |
|---|-----|
| aaa ctc agc att gcc aat gga gtt ttt gca gag aaa gta ttt gat ttt | 337 |
| Lys Leu Ser Ile Ala Asn Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Phe Asp Phe | |
| 95 100 105 110 | |
| cat aag agc tat atg gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct aaa gtg | 385 |
| His Lys Ser Tyr Met Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val | |
| 115 120 125 | |
| gaa aga gtt gat ttt aca aat gat ata caa gaa acc aga ttt aaa att | 433 |
| Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Ile Gln Glu Thr Arg Phe Lys Ile | |
| 130 135 140 | |
| aat aaa tgg att gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aag gtg ttg | 481 |
| Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu | |
| 145 150 155 | |
| ggg gac agc agc ctc agc tca tca gct gtc atg gtg cta gtg aat gct | 529 |
| Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala | |
| 160 165 170 | |
| gtt tac ttc aaa ggc aag tgg aaa tcg gcc ttc acc aag agt gat acc | 577 |
| Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Ser Asp Thr | |
| 175 180 185 190 | |
| ctc agt tgc cat ttc agg tct ccc agc ggt cct gga aaa gca gtt aat | 625 |
| Leu Ser Cys His Phe Arg Ser Pro Ser Gly Pro Gly Lys Ala Val Asn | |
| 195 200 205 | |
| atg atg cat caa gaa cgg agg ttc aat ttg tct acc att cag gag cca | 673 |
| Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Glu Pro | |
| 210 215 220 | |
| cca atg cag att ctt gag cta caa tat cat ggt ggc ata agc atg tac | 721 |
| Pro Met Gln Ile Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr | |
| 225 230 235 | |
| atc atg ttg ccc gag gat gac cta tcc gaa att gaa agc aag ctg agt | 769 |
| Ile Met Leu Pro Glu Asp Asp Leu Ser Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser | |
| 240 245 250 | |
| ttc cag aat cta atg gac tgg aca aat agc agg aag atg aaa tct cag | 817 |
| Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln | |
| 255 260 265 270 | |
| tat gtg aat gtg ttt ctc ccc cag ttc aag ata gag aaa gat tat gaa | 865 |
| Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu | |
| 275 280 285 | |

7/15

atg agg agc cac ttg aaa tct gta ggc ttg gaa gac atc ttt gtt gag 913
 Met Arg Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu
 290 295 300

tcc agg gct gat ctg tct gga att gcc tct gga ggt cgt ctc tat gta 961
 Ser Arg Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val
 305 310 315

tca aag cta atg cac aag tcc ctc ata gag gtc tca gaa gaa ggc acc 1009
 Ser Lys Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr
 320 325 330

gag gca act gct gcc aca gaa agt aac atc gtt gaa aag cta ctt cct 1057
 Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro
 335 340 345 350

gaa tcc acg gtg ttc aga gct gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc att agg 1105
 Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg
 355 360 365

aag aat ggc atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tcg tgt cct 1147
 Lys Asn Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro
 370 375 380

tgaaattcta ttgggtttc catacactaa caggcatgaa gaaacatcat aagtgaatag 1207

aattgtaatt ggaagtacat gg 1229

<210> 4
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 4
 Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp Leu Phe
 1 5 10 15

Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Ser Leu Ile Arg Leu Gly Ala Arg Gly
 35 40 45

Asp Cys Xaa Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Ile Ser Pro Ser
 50 55 60

Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Leu Gly Leu Gln Tyr Gln Leu

8/15

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65 | | | | | 70 | | | | | | 75 | | | | 80 |
| Lys | Arg | Val | Leu | Ala | Asp | Ile | Asn | Ser | Ser | His | Lys | Asp | Xaa | Lys | Leu |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Ser | Ile | Ala | Asn | Gly | Val | Phe | Ala | Glu | Lys | Val | Phe | Asp | Phe | His | Lys |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Ser | Tyr | Met | Glu | Cys | Ala | Glu | Asn | Leu | Tyr | Asn | Ala | Lys | Val | Glu | Arg |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Val | Asp | Phe | Thr | Asn | Asp | Ile | Gln | Glu | Thr | Arg | Phe | Lys | Ile | Asn | Lys |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Trp | Ile | Glu | Asn | Glu | Thr | His | Gly | Lys | Ile | Lys | Lys | Val | Leu | Gly | Asp |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Ser | Ser | Leu | Ser | Ser | Ser | Ala | Val | Met | Val | Leu | Val | Asn | Ala | Val | Tyr |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | | 175 |
| Phe | Lys | Gly | Lys | Trp | Lys | Ser | Ala | Phe | Thr | Lys | Ser | Asp | Thr | Leu | Ser |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Cys | His | Phe | Arg | Ser | Pro | Ser | Gly | Pro | Gly | Lys | Ala | Val | Asn | Met | Met |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| His | Gln | Glu | Arg | Arg | Phe | Asn | Leu | Ser | Thr | Ile | Gln | Glu | Pro | Pro | Met |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Gln | Ile | Leu | Glu | Leu | Gln | Tyr | His | Gly | Gly | Ile | Ser | Met | Tyr | Ile | Met |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Leu | Pro | Glu | Asp | Asp | Leu | Ser | Glu | Ile | Glu | Ser | Lys | Leu | Ser | Phe | Gln |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Asn | Leu | Met | Asp | Trp | Thr | Asn | Ser | Arg | Lys | Met | Lys | Ser | Gln | Tyr | Val |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Asn | Val | Phe | Leu | Pro | Gln | Phe | Lys | Ile | Glu | Lys | Asp | Tyr | Glu | Met | Arg |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Ser | His | Leu | Lys | Ser | Val | Gly | Leu | Glu | Asp | Ile | Phe | Val | Glu | Ser | Arg |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Ala | Asp | Leu | Ser | Gly | Ile | Ala | Ser | Gly | Gly | Arg | Leu | Tyr | Val | Ser | Lys |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Leu | Met | His | Lys | Ser | Leu | Ile | Glu | Val | Ser | Glu | Glu | Gly | Thr | Glu | Ala |

9/15

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | | | 325 | | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Thr | Ala | Ala | Thr | Glu | Ser | Asn | Ile | Val | Glu | Lys | Leu | Leu | Pro | Glu | Ser | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| Thr | Val | Phe | Arg | Ala | Asp | Arg | Pro | Phe | Leu | Phe | Val | Ile | Arg | Lys | Asn | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| Gly | Ile | Ile | Leu | Phe | Thr | Gly | Lys | Val | Ser | Cys | Pro | | | | | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |

<210> 5
 <211> 1147
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1104)

| | |
|---|-----|
| <400> 5 | |
| ttc gac tta ttc aga gag atg gat agt agc caa gga aat gga aat gta | 48 |
| Phe Asp Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val | |
| 1 5 10 15 | |
| ttc ttc tct tcc ctg agc atc ttc act gcc ctg acc cta atc cgt ctg | 96 |
| Phe Phe Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Thr Leu Ile Arg Leu | |
| 20 25 30 | |
| ggt gct cga ggt gac tgt gca cgt cag att gac aag gca ctg cac ttt | 144 |
| Gly Ala Arg Gly Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe | |
| 35 40 45 | |
| aac ata cca tca aga caa gga aac tca tct aat aat cag cca gga ctt | 192 |
| Asn Ile Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Asn Gln Pro Gly Leu | |
| 50 55 60 | |
| cag tat caa ttg aaa aga gtt ctt gct gac ata aac tca tct cat aag | 240 |
| Gln Tyr Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| gat tat gaa ctc agc att gcc act gga gtt ttt gca gaa aaa gtc tat | 288 |
| Asp Tyr Glu Leu Ser Ile Ala Thr Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Tyr | |
| 85 90 95 | |
| gac ttt cat aag aac tac att gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct | 336 |
| Asp Phe His Lys Asn Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala | |

10/15

| 100 | | | | | | 105 | | | | | | 110 | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| aaa | gtg | gaa | aga | gtt | gac | ttc | aca | aat | gat | gta | caa | gat | acc | aga | ttt | 384 | | |
| Lys | Val | Glu | Arg | Val | Asp | Phe | Thr | Asn | Asp | Val | Gln | Asp | Thr | Arg | Phe | | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | | |
| aaa | att | aat | aaa | tgg | att | gaa | aat | gag | aca | cat | gga | aag | atc | aag | aag | 432 | | |
| Lys | Ile | Asn | Lys | Trp | Ile | Glu | Asn | Glu | Thr | His | Gly | Lys | Ile | Lys | Lys | | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | |
| gtg | ttg | ggc | gac | agc | agc | ctc | agc | tcg | tcg | gct | gtc | atg | gtg | ctg | gtg | 480 | | |
| Val | Leu | Gly | Asp | Ser | Ser | Leu | Ser | Ser | Ser | Ala | Val | Met | Val | Leu | Val | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | |
| aac | gct | gtt | tac | ttc | aaa | ggc | aaa | tgg | aaa | tcg | gcc | ttc | acc | aag | act | 528 | | |
| Asn | Ala | Val | Tyr | Phe | Lys | Gly | Lys | Trp | Lys | Ser | Ala | Phe | Thr | Lys | Thr | | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | |
| gat | acc | ctc | agt | tgc | cgt | ttt | agg | tct | ccc | acg | tgt | cct | gga | aaa | gta | 576 | | |
| Asp | Thr | Leu | Ser | Cys | Arg | Phe | Arg | Ser | Pro | Thr | Cys | Pro | Gly | Lys | Val | | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | |
| gtt | aat | atg | atg | cat | caa | gaa | cgg | cgg | ttc | aat | ttg | tct | acc | att | cag | 624 | | |
| Val | Asn | Met | Met | His | Gln | Glu | Arg | Arg | Phe | Asn | Leu | Ser | Thr | Ile | Gln | | | |
| | | 195 | | | | 200 | | | | | | 205 | | | | | | |
| cag | cca | cca | atg | cag | gtt | ctt | gag | ctc | caa | tat | cat | ggt | ggc | ata | agc | 672 | | |
| Gln | Pro | Pro | Met | Gln | Val | Leu | Glu | Leu | Gln | Tyr | His | Gly | Gly | Ile | Ser | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | |
| atg | tac | att | atg | ctg | cct | gag | gat | ggc | cta | tgt | gaa | att | gaa | agc | aag | 720 | | |
| Met | Tyr | Ile | Met | Leu | Pro | Glu | Asp | Gly | Leu | Cys | Glu | Ile | Glu | Ser | Lys | | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | | |
| ctg | agt | ttc | cag | aat | ctg | atg | gac | tgg | acc | aat | agg | agg | aaa | atg | aaa | 768 | | |
| Leu | Ser | Phe | Gln | Asn | Leu | Met | Asp | Trp | Thr | Asn | Arg | Arg | Lys | Met | Lys | | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | |
| tct | cag | tat | gtg | aac | gtg | ttt | ctc | ccc | cag | ttc | aag | ata | gag | aag | aat | 816 | | |
| Ser | Gln | Tyr | Val | Asn | Val | Phe | Leu | Pro | Gln | Phe | Lys | Ile | Glu | Lys | Asn | | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | |
| tat | gaa | atg | acg | cac | cac | ttg | aaa | tcc | tta | ggc | ttg | aaa | gat | atc | ttt | 864 | | |
| Tyr | Glu | Met | Thr | His | His | Leu | Lys | Ser | Leu | Gly | Leu | Lys | Asp | Ile | Phe | | | |
| | | 275 | | | | 280 | | | | | | 285 | | | | | | |
| gat | gag | tcc | agt | gca | gat | ctc | tct | gga | att | gcc | tct | gga | ggt | cgt | ctc | 912 | | |
| Asp | Glu | Ser | Ser | Ala | Asp | Leu | Ser | Gly | Ile | Ala | Ser | Gly | Gly | Arg | Leu | | | |

11/15

| 290 | 295 | 300 | |
|---|-----|-----|------|
| tac gta tca aag cta atg cac aag tca ttc ata gag gtc tca gag gag | | | 960 |
| Tyr Val Ser Lys Leu Met His Lys Ser Phe Ile Glu Val Ser Glu Glu | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| ggc act gaa gcc act gct gcc aca gaa aat aac att gtt gaa aag cag | | | 1008 |
| Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Asn Asn Ile Val Glu Lys Gln | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| ctt cct gag tcc aca gtg ttc aga gcc gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc | | | 1056 |
| Leu Pro Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| atc aag aag aat gac atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tct tgt cct | | | 1104 |
| Ile Lys Lys Asn Asp Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| tgaaattcga ttgtgtttcc tatacagtaa caggcatcaa gaa | | | 1147 |

<210> 6

<211> 368

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

| | |
|---|--|
| Phe Asp Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val | |
| 1 5 10 15 | |
| Phe Phe Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Thr Leu Ile Arg Leu | |
| 20 25 30 | |
| Gly Ala Arg Gly Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe | |
| 35 40 45 | |
| Asn Ile Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Asn Gln Pro Gly Leu | |
| 50 55 60 | |
| Gln Tyr Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| Asp Tyr Glu Leu Ser Ile Ala Thr Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Tyr | |
| 85 90 95 | |
| Asp Phe His Lys Asn Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala | |
| 100 105 110 | |

12/15

Lys Val Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Val Gln Asp Thr Arg Phe
 115 120 125

Lys Ile Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys
 130 135 140

Val Leu Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val
 145 150 155 160

Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Thr
 165 170 175

Asp Thr Leu Ser Cys Arg Phe Arg Ser Pro Thr Cys Pro Gly Lys Val
 180 185 190

Val Asn Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln
 195 200 205

Gln Pro Pro Met Gln Val Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser
 210 215 220

Met Tyr Ile Met Leu Pro Glu Asp Gly Leu Cys Glu Ile Glu Ser Lys
 225 230 235 240

Leu Ser Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Arg Arg Lys Met Lys
 245 250 255

Ser Gln Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn
 260 265 270

Tyr Glu Met Thr His His Leu Lys Ser Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe
 275 280 285

Asp Glu Ser Ser Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu
 290 295 300

Tyr Val Ser Lys Leu Met His Lys Ser Phe Ile Glu Val Ser Glu Glu
 305 310 315 320

Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Asn Asn Ile Val Glu Lys Gln
 325 330 335

Leu Pro Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val
 340 345 350

Ile Lys Lys Asn Asp Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro
 355 360 365

<210> 7
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 7
atggatccgc cgccatggcc tcccttgctg cagcaaatgc agag 44

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 8
tatacctgagg cagtgttaac atgaag 26

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 9
gtcgacattg attattgact ag 22

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10
ccataaggtc atgtactg 18

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 11
cttctggcgt gtgaccggcg 20

<210> 12
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12
atcgaattct gagatcataa tccctgtggg atgc 34

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 13
ttattcagtg gcaaagtttc ttgcccttga 30

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15/15

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

tcgagggatc ttcataagag aagag

25

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized domain peptide of human megsin

<400> 12

Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu Lys Arg Val Phe Ser Asp
1 5 10 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06988

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K67/027, A61P13/12, A61K45/00, C12N15/12,
C12N15/85, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K67/027, A61P13/12, A61K45/00, C12N15/12,
C12N15/85, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DIALOG (BIOSIS)
JOIS (JICST FILE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | Medical Immunology, Vol.15, No.2, 217-220, (1988) | 1-8 |
| A | Biol. Pharm. Bull., Vol.20, No.3, 255-258, (1997) | 1-8 |
| Y | Igaku no Ayumi, Vol.190, No.1, (1999.7.3) | 1-8 |
| Y | J. Clin. Invest., Vol.120, No.4, 828-836, (1998) | 1-8 |
| Y | WO, 99/015652, A (MIYATA, Toshio), 01 April, 1999 (01.04.99) & AU, 9096398, A | 1-8 |
| A | EP, 583884, A1 (Suntory Ltd.), 23 February, 1994 (23.02.94) & JP, 6-313000, A & US, 5874253, A & CA, 2100690, A & HU, 67124, A & EP, 583884, B1 & US, 5972886, A1 & AU, 703648, B & ES, 2108228, T & DK, 583884, T & US, 5831030, A1 & DE, 69314574, D & AU, 4190893, A & AU, 7538796, A & IL, 106375, D | 1-8 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
26 December, 2000 (26.12.00)

Date of mailing of the international search report
16 January, 2001 (16.01.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06988

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | Youyaku Kagaku Sogo Kenkyu Jigyo; Souyaku Kagaku Kenkyu Houkoku, Dai 1-ki Sogo Houkokusho in 1995, 180-183, (1995) | 1-8 |
| Y | Tanpakushitsu Kakusan Kousho, Vol.40, No.14, 2001-2007, (1995) | 1-8 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06988

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 9
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Since these drugs are specified merely on the basis of the screening method, it is not sufficiently disclosed what substances these drugs are in detail. Thus, these drugs are not sufficiently supported by the description.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A01K67/027, A61P13/12, A61K45/00, C12N15/12,
C12N15/85, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ A01K67/027, A61P13/12, A61K45/00, C12N15/12,
C12N15/85, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2000年
日本国登録実用新案公報 1994-2000年
日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DIALOG (BIOSIS)
JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| Y | Medical Immunology, Vol.15, No.2, 217-220, (1988) | 1-8 |
| A | Biol. Pharm. Bull., Vol.20, No.3, 255-258, (1997) | 1-8 |
| Y | 医学のあゆみ, Vol.190, No.1, (1999.7.3) | 1-8 |
| Y | J. Clin. Invest., Vol.120, No.4, 828-836, (1998) | 1-8 |
| Y | WO, 99/015652, A, (MIYATA, Toshio), 01.4月.1999 (01.04.99) & AU, 9096398, A | 1-8 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.12.00

国際調査報告の発送日

16.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

2B

2914

電話番号 03-3581-1101 内線 3235

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | EP, 583884, A1 (Suntory Ltd.), 23. 2月. 1994 (23. 02. 94) & JP, 6-313000, A & US, 5874253, A & CA, 2100690, A & HU, 67124, A & EP, 583884, B1 & US, 5972886, A1 & AU, 703648, B & ES, 2108228, T & DK, 583884, T & US, 5831030, A1 & DE, 69314574, D & AU, 4190893, A & AU, 7538796, A & IL, 106375, D | 1 - 8 |
| A | 創薬科学総合研究事業 創薬科学研究報告 第1期総合報告書 平成7年, 180-183, (1995) | 1 - 8 |
| Y | 蛋白質核酸酵素, Vol. 40, No. 14, 2001-2007, (1995) | 1 - 8 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 _____ 9 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
スクリーニング方法のみで特定された薬剤であるので、具体的にどのような物質であるのか十分に開示されておらず、明細書による十分な裏付けを欠いている。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。